SQUALEN-HOPEN-CYCLASE AUS BACILLUS ACIDOCALDARIUS:

CHARAKTERISIERUNG UND ANREICHERUNG

DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

der Fakultät für Biologie
der Eberhard-Karls-Universität Tübingen

vorgelegt von
BRIGITTE SECKLER, geb. WÜBBEN
aus Bremerhaven

1984

SQUALEN-HOPEN-CYCLASE AUS *BACILLUS ACIDOCALDARIUS*: CHARAKTERISIERUNG UND ANREICHERUNG

DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Naturwissenschaften

der Fakultät für Biologie der Eberhard-Karls-Universität Tübingen

vorgelegt von

BRIGITTE SECKLER
aus Ravensburg

1984

SQUALEN-HOPEN-CYCLASE AUS BACILLUS ACIDOCALDARIUS:

CHARAKTERISIERUNG UND ANREICHERUNG

DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

der Fakultät für Biologie
der Eberhard-Karls-Universität Tübingen

vorgelegt von
BRIGITTE SECKLER, geb. WÜBBEN
aus Bremerhaven

1984

Tag der mündlichen Prüfung: 12.10.1984

Dekan	:	Prof. Dr. H.U. Seitz
1. Berichterstatter	:	Prof. Dr. K. Poralla
2. Berichterstatter	:	Prof. Dr. V. Braun

Die vorliegende Arbeit wurde zwischen November 1981 und März 1984 am Institut für Biologie II, Lehrbereich Mikrobiologie I (Prof. Dr. H. Zähner) der Universität Tübingen angefertigt.

Herrn Prof. Dr. K. Poralla danke ich für die Themenstellung und für seine ständige Bereitschaft zu Diskussionen.

Herrn Dr. H.-J. Reinecke danke ich für die Bereitstellung eines Arbeitsplatzes im Isotopenlabor der Universität Tübingen, seinen Mitarbeitern, den Herren Bierbaum, Büthe, Schmidt und Stumpp, für den prompten Service und die schnelle Hilfe bei Gerätedefekten. Prof. Dr. A. Jung und seiner Arbeitsgruppe möchte ich für das Ausleihen so mancher Kleingeräte danken. Prof. Dr. K. Wegmann gilt mein besonderer Dank für seine freundliche Hilfe beim Instandsetzen des Radiogaschromatographen, Herrn Prof.Dr.J.E.Schultz dafür, daß er mir für die Enzymanreicherung Gradientenmischer, Leitfähigkeitsmeßzelle und Ultrafiltrationsapparatur zur Verfügung stellte, sowie Prof. Dr. G. Winkelmann und seiner Arbeitsgruppe für die freundliche und schnelle Hilfe beim Fehlen von Geräten oder Chemikalien.

Herrn Prof. Dr. W. Bessler danke ich für seine freundliche Hilfe beim Immunisieren der Nagetiere, Herrn Hans-Konrad Peters für die Durchführung der massenspektrometrischen Arbeiten.

Herrn Thomas Härtner möchte ich sehr herzlich für seine Hilfe bei der Fermentation der Bakterien und für die Präparation der Vergleichssubstanz für das Diplopterol danken, Herrn Wolfgang Krischke ebenso herzlich für seine ständige Hilfsbereitschaft.

Meinem Mann, Robert Seckler, gilt mein besonderer Dank. Er lieferte mir manche recht wertvolle Anregung für diese Arbeit und half mir bei den immunochemischen Arbeiten.

INHALTSVERZEICHNIS

Seite

I. EINLEITUNG..... 1

II. MATERIALIEN und METHODEN..... 20

1. Materialien..... 20

2. Methoden..... 21

2.1. Anzucht von *Bacillus acidocaldarius*..... 21
2.2. Squalencyclase-Enzymtest..... 21
2.2.1. Aufarbeitung der *Bacillus acidocaldarius*-Zellen..... 21
2.2.1.1. Lysozym-Behandlung..... 21
2.2.1.2. Ultraschall-Behandlung..... 22
2.2.2. Herstellung der [^{3}H]-Squalen-Stammlösung..... 22
2.2.3. Standardinkubation..... 23
2.2.4. Lipidextraktion..... 24
2.2.5. Trennung von Substrat und Produkten..... 24
2.2.5.1. Dünnschichtchromatographische Trennung..... 24
2.2.5.2. (Radio-)Gaschromatographische Trennung..... 25
2.2.6. Quantitative Bestimmung von Substrat und Produkten nach dünnschichtchromatographischer Trennung..... 26
2.2.6.1. Radio-Dünnschichtabtastung..... 26
2.2.6.2. Flüssigszintillationszählung der ausgekratzten Dünnschichtchromatographie-Flecken 26
2.3. Massenspektrometrische Produktidentifizierung.. 27
2.4. Anreicherung der Squalencyclase..... 28
2.4.1. Membranpräparation..... 28
2.4.1.1. Zellaufschluß..... 28
2.4.1.2. Differentielle Zentrifugation..... 28
2.4.2. Solubilisierung der Squalencyclase..... 28
2.4.3. DEAE-Cellulose-Chromatographie..... 29
2.4.3.1. Vorbereitung des Säulenmaterials..... 29
2.4.3.2. DEAE-Chromatographie der Squalencyclase.... 29
2.4.4. Ultrafiltration..... 30
2.4.5. XAD-Chromatographie..... 30
2.4.6. Gelfiltration an Sephadex G 100..... 31

Seite

2.5. SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese..... 31
2.5.1. Probenvorbereitung..... 31
2.5.2. Diskontinuierliches SDS-Polyacrylamid-Gel.... 32
2.5.3. Elektrophoreselauf..... 32
2.5.4. Färben, Entfärben und Trocknen der Gele..... 33
2.6. Immunochemische Methoden..... 33
2.6.1. Präparation des Antigens..... 33
2.6.2. Immunisierung..... 34
2.6.3. Gewinnung der Antiseren..... 34
2.6.4. Test der Antiseren..... 34
2.6.4.1. Test auf Hemmung der Squalencyclase-Aktivität..... 34
2.6.4.2. Test auf anti-M_r=75000-Protein-Antikörper.. 35
2.7. Proteinbestimmung

III. ERGEBNISSE..... 37

3. Entwicklung eines Enzymtests..... 37

3.1. Inkubationsbedingungen des Squalencyclase-Tests 37
3.1.1. Wahl der Enzymquelle..... 37
3.1.2. Wahl der Squalenkonzentration..... 38
3.1.3. Wahl des Emulgierungsmittels für das Squalen. 38
3.1.4. Wahl des Puffersystems..... 39
3.2. Extraktion von Substrat und Reaktionsprodukten. 40
3.3. Trennung und quantitative Bestimmung von Substrat und Produkten..... 40
3.3.1. Trennung von Squalen, Hopen und Diplopterol.. 41
3.3.1.1. Dünnschichtchromatographische Trennung..... 41
3.3.1.2. Säulenchromatographische Trennung..... 42
3.3.1.3. (Radio-)Gaschromatographische Trennung..... 42
3.3.2. Quantitative Bestimmung von Squalen, Hopen und Diplopterol..... 44

4. Identifizierung der Cyclisierungsprodukte..... 46

4.1. Dünnschichtchromatographische Identifizierung.. 46
4.2. Radiogaschromatographische Identifizierung..... 46
4.3. Gaschromatographische Identifizierung..... 47

Seite

4.4. Massenspektrometrische Identifizierung..... 47

5. Optimierung des Squalencyclase-Tests..... 49

5.1. Optimierung der Inkubationstemperatur..... 49
5.2. Optimierung des Test-pH..... 50

6. Charakterisierung der Squalen-Hopen-Cyclase..... 50

6.1. Lokalisierung der Squalencyclase..... 50
6.2. Solubilisierung der Squalencyclase..... 52
6.3. Stabilität der Squalencyclase..... 55
6.4. Kinetik der Squalencyclase-Reaktion..... 57
6.5. Eigenschaften der Squalencyclase..... 59
6.5.1. Sauerstoffbedarf der Squalencyclisierung..... 60
6.5.2. Einfluß von Detergenzien auf die Squalencyclase-Aktivität..... 60
6.5.2.1. Detergenzeinfluß im Ultraschallhomogenat... 60
6.5.2.2. Detergenzeinfluß in Membranen..... 62
6.5.2.3. Detergenzeinfluß im tritonfreien Solubilisat..... 62
6.5.3. Einfluß der Ionenstärke auf die Squalencyclase-Aktivität..... 64
6.5.4. Einfluß gruppenspezifischer Reagenzien auf die Squalencyclase-Aktivität..... 65
6.5.5. Einfluß sonstiger Stoffe auf die Squalencyclase-Aktivität..... 68

7. Anreicherung der Squalencyclase..... 70

7.1. Reinigung der Cytoplasmamembran..... 70
7.2. Solubilisierung der Squalencyclase..... 70
7.3. DEAE-Cellulose-Chromatographie des Solubilisats 71
7.4. Zusammenfassung der Squalencyclase-Anreicherung 71

IV. DISKUSSION..... 77

V. ZUSAMMENFASSUNG..... 95

VI. LITERATURVERZEICHNIS..... 97

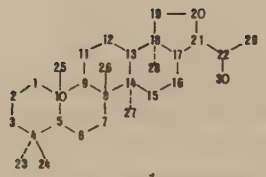
In der vorliegenden Arbeit wurden folgende Abkürzungen verwendet:

B.a.	*Bacillus acidocaldarius*
bidest. Wasser	Millipore-gefiltertes, dest. Wasser
BSA	Rinderserumalbumin
cmc	kritische Micellenkonzentration
DC	Dünnschichtchromatographie
DEAE-	Diethylaminoethyl-
dest. Wasser	entionisiertes Wasser
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendinitrilotetraacetat
FID	Flammenionisationsdetektor
GC	Gaschromatographie
LSC	Flüssigszintillationszähler, -lung
M_r	relatives Molekulargewicht
MS	Massenspektrometrie
RD	Radiodetektor
SDS	Natriumdodecylsulfat
T_r	Retentionszeit
Tris	Tris-hydroxymethylaminomethan
upm	Umdrehungen pro Minute

I. EINLEITUNG

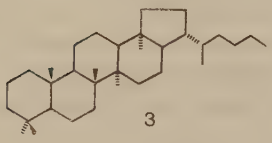
Als Zeugen vergangenen Lebens enthalten geologische Sedimentgesteine neben Fossilien geringe Konzentrationen organischer Substanzen, deren biologischer Ursprung trotz mikrobieller und/oder geochemischer Veränderung der Ausgangsstoffe noch deutlich zu erkennen ist. Unter diesen Verbindungen finden sich besonders häufig Stoffe, die durch den hohen Verzweigungsgrad oder die starke Cyclisierung ihres Kohlenstoffgerüstes größeren Strukturveränderungen widerstanden haben, z.B. Steroide, Porphyrine und Triterpene (ALBRECHT & OURISSON, 1971).

Unter den Triterpenen zeichnet sich eine Gruppe durch auffallend ubiquitäre Verbreitung in Sedimentgesteinen unterschiedlichsten Alters aus : die Hopanoide, eine Gruppe pentacyclischer Triterpene mit einem Hopan-Grundgerüst (Abb.1). Hopanoide wurden sowohl in Erdölen und jungen Ablagerungsgesteinen als auch in bis zu 500 Millionen Jahre alten Sedimenten gefunden (OURISSON et al., 1979a). Abbildung 1 zeigt einige Beispiele solcher Geo-Hopanoide; die Gruppe umfaßt heute nahezu 150 charakterisierte Substanzen und jährlich werden neue entdeckt (HUSSLER et al., 1984; VALISOLALAO et al., 1984). Die in den Sedimenten gefundenen Hopanoide haben häufig mehr als 30 C-Atome im Molekül, stellen also höhere Homologe des Hopans dar. Da die als sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe in Rinden einiger tropischer Bäume, sowie in manchen Flechten und Farnen vorkommenden Hopanoide sich jedoch durch das Fehlen einer verlängerten Seitenkette auszeichnen (HANSEN, 1971-1983) und die ubiquitäre Verbreitung dieser Substanzklasse nicht erklären konnten, blieb die Frage nach ihrem biologischen Ursprung ungeklärt, bis sie überraschenderweise als Bestandteil vieler Bakterien identifiziert werden konnten (ROHMER et al., 1979, 1984).

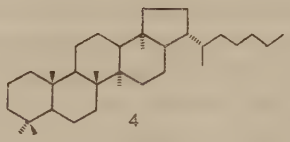


1

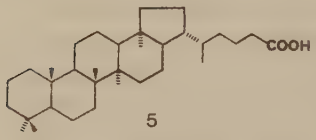
2



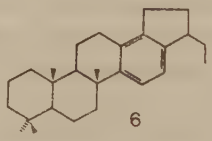
3



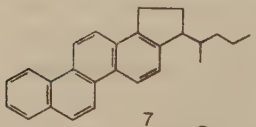
4



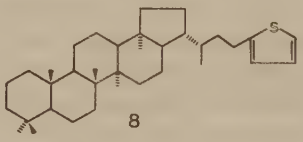
5



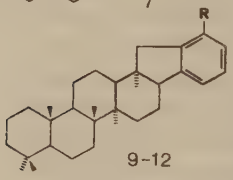
6



7



8



9-12

R = -H , $-CH_3$, $-C_2H_5$, $-C_3H_7$

Abb. 1 : Hopanoide aus geologischen Sedimenten und Erdölen

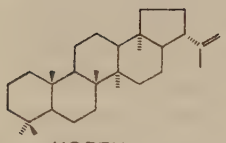
Allen Hopanoiden gemeinsam ist das starre Hopan-Grundgerüst (1 in schematischer bzw. 2 in räumlicher Darstellung); Geohopanoide nach OURISSON et al. (1979a; 3-7), VALISOLALAO et al. (1984; 8) und HUSSLER et al. (1974; 9-12).

——— β-Seite (Oberseite)

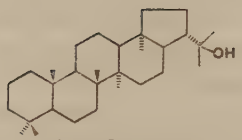
- - - - α-Seite (Unterseite)

In etwa der Hälfte von ca. 100 untersuchten Bakterienstämmen konnten Hopanoide nachgewiesen werden (ROHMER et al., 1979, 1984). So enthalten alle untersuchten *Rhodospirillaceae* und obligat methylothrophen Bakterien und die meisten Cyanobakterien, sowie alle untersuchten *Acetobacter*-Stämme und einige andere Gattungen Hopanoide, deren Gehalt jedoch von Gruppe zu Gruppe mit 5 bis 5000 µg je g Trockengewicht starken Schwankungen unterworfen ist. Zu den in Bakterien vorkommenden Hopanoiden zählen neben den C_{30}-Derivaten, Hop-22(29)-en (Diplopten) und Hopan-22-ol (Diplopterol), die besonders domonierenden oxygenierten C_{35}-Homologen des Hopans (Tetrahydroxybakteriohopan u.ä.), daneben kommen auch komplexe Glykolipide mit Hopan-Anteil vor (LANGWORTHY et al., 1976a). Abbildung 2 zeigt einige bakterielle Hopanoide. Allen gemeinsam ist die starre, quasi-planare Ringstruktur. Das in den Bakterien unter den Hopanoiden überwiegende Tetrahydroxybakteriohopan, kurz "Tetrol" genannt, weist durch seine hydrophobe Ringstruktur mit hydrophiler Kopfgruppe einen amphiphilen Charakter auf. Da auch seine molekularen Ausmaße mit denen der in Eukaryonten-Membranen vorkommenden Sterolen in etwa übereinstimmen, wird angenommen, daß den Hopanoiden in Prokaryonten-Membranen eine sterolähnliche Funktion zukommt (ROHMER et al.,1976; PORALLA,1982).

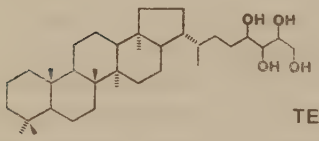
Sterole haben - neben ihrer Rolle als Emulgatoren (Gallensäuren) - in eukaryontischen Lebewesen zwei prinzipielle Aufgaben : Zum einen bilden sie einen wichtigen Bestandteil eukaryontischer Membranen (NES, 1974; DEMEL & DE KRUYFF, 1976; BLOCH, 1983), zum anderen wirken sie als Hormone (METZLER; 1977). Als Membrankomponenten erreichen sie hohe prozentuale Anteile; so bestehen Erythrocyten-Membranen zu 23 % des Lipidtrockengewichts aus Cholesterol (ALBERTS et al., 1983). Abbildung 3 zeigt einige typische Membransterole; allen gemeinsam ist das starre, planare Steran-Grundgerüst mit freier ß-ständiger Hydroxylgruppe am C_3 und eine ß-ständige, acht bis zehn C-Atome lange Alkylseitenkette am C_{17}. Während in Säugern das Cholesterol



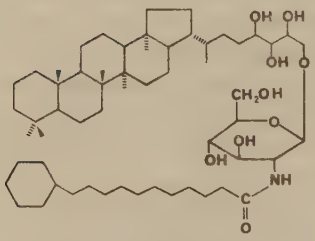
HOPEN
(HOP-22(29)-EN, DIPLOPTEN)



DIPLOPTEROL
(HOPAN-22-OL)



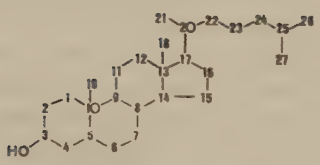
TETRAHYDROXYBAKTERIOHOPAN
»TETROL«



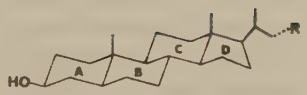
HOPANGLYKOLIPID

Abb. 2 : Bakterielle Hopanoide

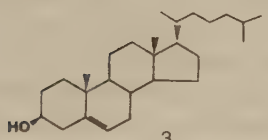
Die Abbildung zeigt einige in Bakterien vorkommende Hopanoide; Hopen, Diplopterol und "Tetrol" nach ROHMER et al. (1979), Hopan-Glykolipid nach LANGWORTHY et al. (1976a).



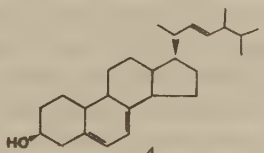
1



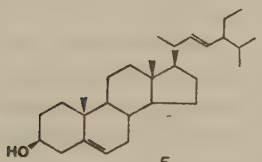
2



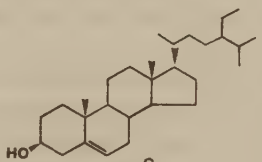
3



4



5



6

Abb. 3 : Struktur einiger Membransterole

Allen Sterolen gemeinsam ist das starre Sterol-Grundgerüst (1 in schematischer, 2 in räumlicher Darstellung) mit 3ß-OH-Gruppe sowie 17ß-Alkylseitenkette.

3 Cholesterol

4 Ergosterol

5 Stigmasterol

6 Sitosterol

als Membransterol überwiegt, haben bei Pflanzen, Pilzen und Hefen andere Sterole dessen Aufgabe übernommen. So dominieren Sitosterol und Stigmasterol in Pflanzen, während Ergosterol das Hauptsterol von Pilzen und Hefen darstellt.

Physikochemische Untersuchungen an artifiziellen Membransystemen lieferten wesentliche Beiträge zur Aufklärung der Funktion von Sterolen in Membranen (DEMEL & DE KRUYFF, 1976; BLOCH, 1983). Mit calorimetrischen Methoden konnte gezeigt werden, daß der bei Phospholipidvesikeln beobachtete scharfe Phasenübergang vom kristallinen in den flüssig-kristallinen Membranzustand durch Zugabe von genügend Cholesterol (mindestens 33 Mol%) gelöscht wird (LADBROOKE et al., 1968). Auch Experimente mit Fluoreszenzsonden (Fluoreszenz-Depolarisations-Messungen, DAHL et al., 1980) bestätigten, daß Cholesterol unterhalb des Phasenüberganges auflockernd (verflüssigend), oberhalb dagegen kondensierend (verfestigend) auf die Struktur der Lipiddoppelschicht wirkt. Dieser kondensierende Effekt von Cholesterol auf die Phospholipide oberhalb ihrer Phasenübergangstemperatur wurde durch Versuchsergebnisse aus Monolayer-Experimenten bekräftigt. Diese zeigten, daß der Flächenbedarf pro Molekül in sterolhaltigen Lipidfilmen gegenüber den Werten in sterolfreien Monolayern verringert ist (DEMEL & DE KRUYFF, 1976). In Liposomen bewirkt Cholesterol oberhalb des Phasenübergangs der getesteten Lipide eine Erniedrigung der Permeabilität (DE GIER et al., 1968). Da auch Ergosterol und die Phytosterole gleichgerichtete Effekte auf Modellmembranen ausüben, wird angenommen, daß die Sterole im physiologischen Temperaturbereich (flüssig-kristalline Membran) durch Herabsetzen der Beweglichkeit der Lipid-Acylketten die Membran kondensieren und ihre Permeabilität verringern (DEMEL & DE KRUYFF, 1976). Daneben wird auch eine membranstabilisierende Wirkung durch Trennung der geladenen Lipid-Kopfgruppen durch die Sterole diskutiert (YEAGLE et al., 1977).

Untersuchungen an sterol-auxothrophen Zellen zeigten, daß Sterole lebensnotwendig sind. So können Sterol-Demethylase-Mutanten von chinesischen Hamster-Ovarzellen nur in cholesterol-komplementiertem Medium überleben (CHANG et al., 1977). Neben den oben erwähnten physikochemischen Methoden wurden diese und andere sterol-auxothrophe Zellen (anaerob wachsende *Saccharomyces cerevisiae*, Epoxysqualencyclase-defekte *Saccharomyces cerevisiae*-GL7-Mutanten, Mycoplasmen u.a.) herangezogen, um die Frage nach den Anforderungen an die Struktur der Sterole für ihre Wirksamkeit auf die Membranfluidität zu klären (BLOCH, 1983). Bei diesen Untersuchungen wurden natürliche und synthetische Sterole und Sterolderivate auf ihre physikochemische (Experimente mit artifiziellen Membransystemen) und physiologische Wirksamkeit (biologischer Test auf Wachstumsförderung von Sterol-Auxothrophen) getestet. Die Ergebnisse legen nahe, daß die Sterole in Zellmembranen mehrere Funktionen erfüllen, die unterschiedliche Anforderungen an die Struktur des Sterols stellen :

- Die Regulation der Fluidität und Permeabilität von Zellmembranen erfordert folgende Eigenschaften des integrierten Sterols: Für optimale van-der-Waalssche-Wechselwirkung des Sterols mit den Acylketten der Membranlipide ist ein planares Sterolgerüst mit freier β-ständiger OH-Gruppe am C_3 und β-ständiger Seitengruppe am C_{17} mit 8 bis 10 C-Atomen, sowie eine möglichst freie α-Seite des Sterols notwendig.Cholesterol erfüllt diese Voraussetzungen optimal; jede Änderung seiner Struktur vermindert den Einfluß des Sterols auf Membranfluidität und -permeabilität. Dabei wirkt sich eine α-Methylgruppe am C_{14} besonders ungünstig aus, während zusätzliche Methylgruppen am C_4 die membrankondensierende Wirkung weniger stark schwächen (DEMEL & DE KRUYFF, 1976; DAHL et al., 1980a; BLOCH, 1983).
- Die Trennung der Lipidkopfgruppen wird auch von Sterolen gewährleistet, die weder eine freie Hydroxylgruppe, eine planare Ringstruktur, noch eine von Methylgruppen freie

α-Seite aufweisen (YEAGLE et al., 1977). Solche Substanzen, z.B. Lanosterol oder β-Amyrin, haben nur einen schwachen Einfluß auf die Membranviskosität, können aber z.B. das Wachstum von Mycoplasmen gegenüber dem im supplementfreien Medium erzielten steigern, ohne daß jedoch das mit Cholesterol zu beobachtende Optimalwachstum erreicht wird (ODRIOZOLA et al., 1978; DAHL et al., 1980b).

- Eine für Cholesterol spezifische Wirkung konnten DAHL et al. (1981) in Mycoplasmen nachweisen: Diese zeigen in Lanosterol-supplementiertem Medium bei Zugabe von geringen, nicht-membrankondensierenden Cholesterolmengen ein über den additiven Effekt gesteigertes Wachstum (synergistischer Effekt). Hier scheint die in Gegenwart anderer Sterole wachstumslimitierende Aufnahme ungesättigter Fettsäuren sowie die Phospholipid-Biosynthese spezifisch durch Cholesterol gesteigert zu werden. Ein synergistischer Effekt in Hefen, hier durch Ergosterol verursacht, kann ähnlich erklärt werden (RAMGOPAL & BLOCH, 1983).

Sterole kommen bis auf wenige Ausnahmen (*Mycoplasma, Methylococcus capsulatus*) in Prokaryonten nicht vor. Lange Zeit war die Ansicht verbreitet, Bakterien könnten eine zusätzliche Stabilisierung ihrer Zellmembran durch Sterole oder ähnliche Stoffe entbehren, bis das weit verbreitete Vorkommen von Hopanoiden in vielen Bakterien bewiesen wurde (ROHMER et al., 1979,1984). Den Hopanoiden wird in den Membranen eine sterolähnliche Funktion zugeschrieben; so vermutet man z.B., daß die gute Ethanoltoleranz von *Zymomonas mobilis* auf eine Stabilisierung ihrer Zellmembran durch Hopanoide zurückzuführen ist (BARROW et al., 1983; BRINGER et al., 1984). Die sterolähnliche Wirkung von Hopanoiden konnte durch Versuche an Modellmembranen nachgewiesen werden: So führt Tetrahydroxybakteriohopan ("Tetrol") sowohl in Monolayern verschiedener Phospholipide als auch in Liposomen zu einer Löschung des Phasenübergangs

(KANNENBERG et al., 1980, 1983; KANNENBERG, 1983) und erniedrigt in Schwellversuchen die Permeabilität von Liposomen (BISSERET et al., 1983; KANNENBERG, 1983). In "black-lipid"-Membranen erhöht Diplopterol die Viskosität der Lipiddoppelschicht (BENZ et al., 1983). Hopanglykolipid hat dort den gleichen Effekt (BENZ et al., 1983), zeigt in Monolayer-Experimenten eine Phasenübergangslöschung und führt zu einer Erniedrigung der Liposomenpermeabilität für Nicht-Elektrolyte (KANNENBERG, 1983). Diplopterol kondensiert nicht nur den flüssig-kristallinen Bilayer, sondern unterstützt - im Gegensatz zu Hopanglykolipid - auch das Wachstum von Mycoplasmen (KANNENBERG et al., 1982; KANNENBERG 1983).

Diese Versuchsergebnisse zeigen demnach deutliche Parallelitäten in der Wirkungsweise von Sterolen und Hopanoiden und unterstützen die Auffassung, daß diese pentacyclischen Triterpene in Bakterienmembranen die Funktion erfüllen, die in Eukaryontenmembranen den Sterolen zukommt (ROHMER et al., 1979; PORALLA 1982a,b). Das Fehlen von Hopanoiden in etwa 50% der untersuchten Prokaryonten führen ROHMER et al. (1979) darauf zurück, daß diese Bakterien andere Mechanismen zur Membranverfestigung evolviert haben. Als für diesen Zweck geeignet werden Stoffe vorgeschlagen, die die ganze Breite der Membran überspannen können, so C_{40}-Carotinoide mit mono- oder bipolarer hydrophiler Gruppe (ROHMER et al., 1979) und das in vielen Bakterien vorkommende (AMDUR et al., 1978) Squalen (PORALLA, 1982a,b). Letzteres ist in der Lage, geladene Kopfgruppen voneinander zu trennen (LANYI et al, 1978) und erfüllt somit eine der postulierten Sterolaufgaben. Für α,ω-Dihydroxy-C_{40}-Carotinoide konnten BISSERET et al. (1983) in Schwellversuchen mit Liposomen membrankondensierende Wirkungsweise nachweisen.

Allen diesen Stoffen mit membranstabilisierendem Charakter ist die isoprenoide Molekülstruktur gemeinsam, die auf gewisse Ähnlichkeiten ihrer Biosynthesen schließen

läßt. Tatsächlich leiten sich alle aus Mevalonsäure (C_6-Einheit) ab. Diese bildet nach Decarboxylierung als Isopentenyl-Einheit den C_5-Körper, aus dem durch Kopf-Schwanz- und/oder Kopf-Kopf-Kondensationen die höheren Terpenoide entstehen (MANITTO, 1981). Während die Biosynthese der Sterole (Abb.4) über eine sauerstoffabhängige Epoxidierung des Squalens verläuft, werden Hopanoide, Carotinoide und Squalen sauerstoffunabhängig gebildet (MANITTO, 1981); die Hydroxylfunktionen einiger Hopanoide stammen aus H_2O (ROHMER et al., 1980a).

Da Sauerstoff benötigende Reaktionen erst durch die oxygene Photosynthese möglich wurden, werden Hopanoide, Carotinoide und Squalen als phylogenetisch ältere Stoffe mit Sterolfunktion vorgeschlagen (ROHMER et al., 1979; OURISSON et al., 1979b; PORALLA 1982a,b):

Danach wurden in der anaeroben Periode der Erdgeschichte (bis vor etwa 2 Milliarden Jahren) zunächst anaerobe, einfache Biosynthesewege entwickelt, die Squalen bzw. Carotinoide als sterolfunktionelles Endprodukt bildeten, bevor mit anaeroben Cyclisierungen starrere, vielleicht besser funktionsfähige Molekülstrukturen entwickelt wurden (ROHMER et al., 1979; PORALLA 1982a,b). Erst mit Zunahme des Sauerstoffgehalts der Atmosphäre wurde die Epoxidierung des Squalens und mithin die Biosynthese der Sterole möglich, wobei unterschiedliche primäre Cyclisierungsprodukte von Pilzen und Tieren einerseits (Lanosterol) und Pflanzen andererseits (Cycloartenol) nahelegen, daß eine oder beide Cyclisierungsreaktionen erst nach Aufspaltung der Eukaryonten in Photosynthetiker, Pilze und Tiere entwickelt wurden (PORALLA,1982a). Dabei wird angenommen, daß die primären Cyclisierungsprodukte im Laufe der Evolution durch Entwicklung von strukturverändernden Enzymen (Demethylasen u.a.) in immer besser funktionsfähige Sterole umgewandelt wurden, bis daraus die heute physiologischen Sterole entstanden (BLOCH 1979, 1983).

Die direkte Cyclisierung des Squalens zu Hopanoiden (Abb.5) zeigt einen im Vergleich zur Epoxysqualencyclase-

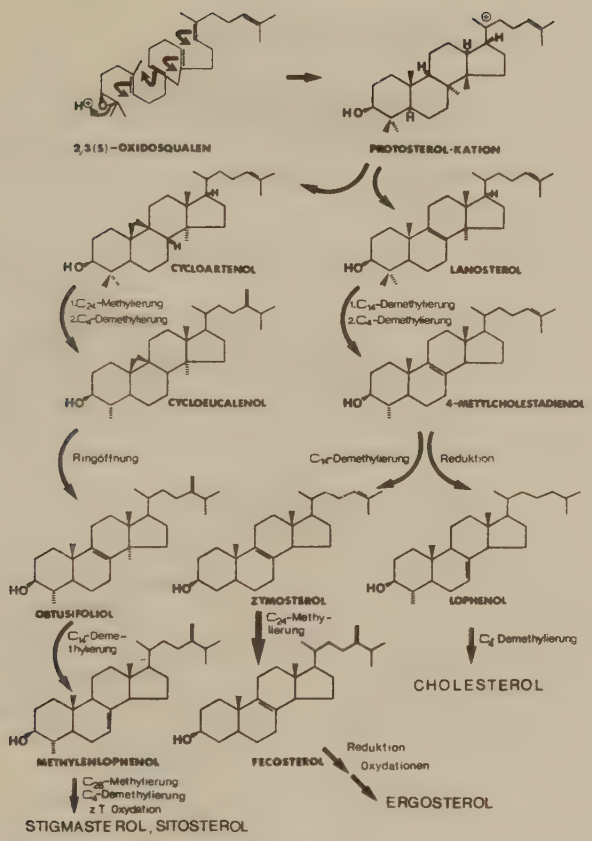


Abb. 4 : Biosynthese von Pflanzen-, Tier- und Hefe-Sterolen (nach HEINTZ & BENVENISTE, 1974)

Reaktion (Abb.6) einfachen Reaktionsablauf: In protonenkatalysierter Reaktion wird Squalen direkt in die Reaktionsprodukte, Diplopterol und Hopen, überführt, ohne daß dazu Hydrid- und Methylgruppen-Verschiebungen notwendig sind (ROHMER et al., 1980a,b). Solche 1,2-Verschiebungen sind

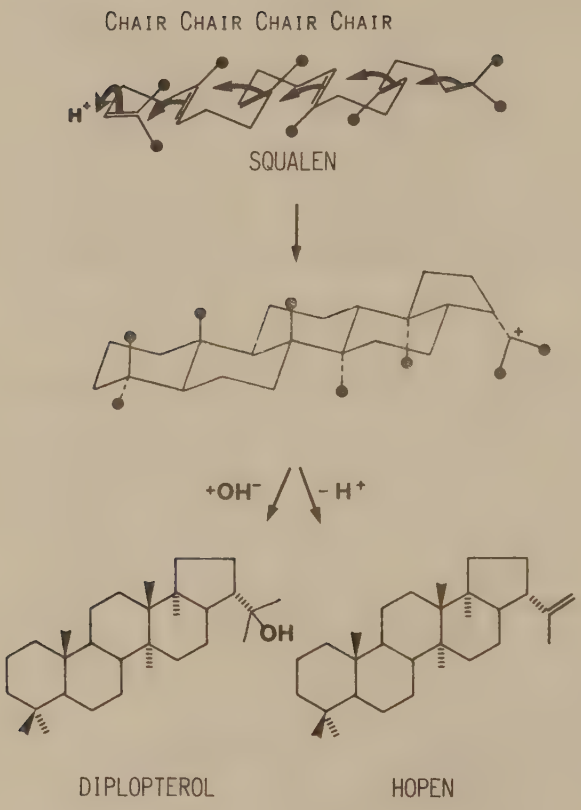


Abb. 5 : Biosynthese von Hopen und Diplopterol

Bei der Bildung dieser Hopanoide wird Squalen, ausgehend von der thermodynamisch günstigen "all-prechair"-Konformation, unter Protonenkatalyse cyclisiert. Die postulierte kationische Zwischenstufe geht durch Verlust eines Protons bzw. Anlagerung eines Hydroxylions in Hopen bzw. Diplopterol über (RICHARDS & HENDRICKSON, 1964; MANITTO, 1981).

für die Bildung von Lanosterol bzw. Cycloartenol verantwortlich und erst in den letzten Jahren näher aufgeklärt worden (VAN TAMELEN et al., 1982; VAN TAMELEN, 1982; MAUGH II, 1982; vergl. auch Abb. 6). Für die Cyclisierung zu Hopanoiden

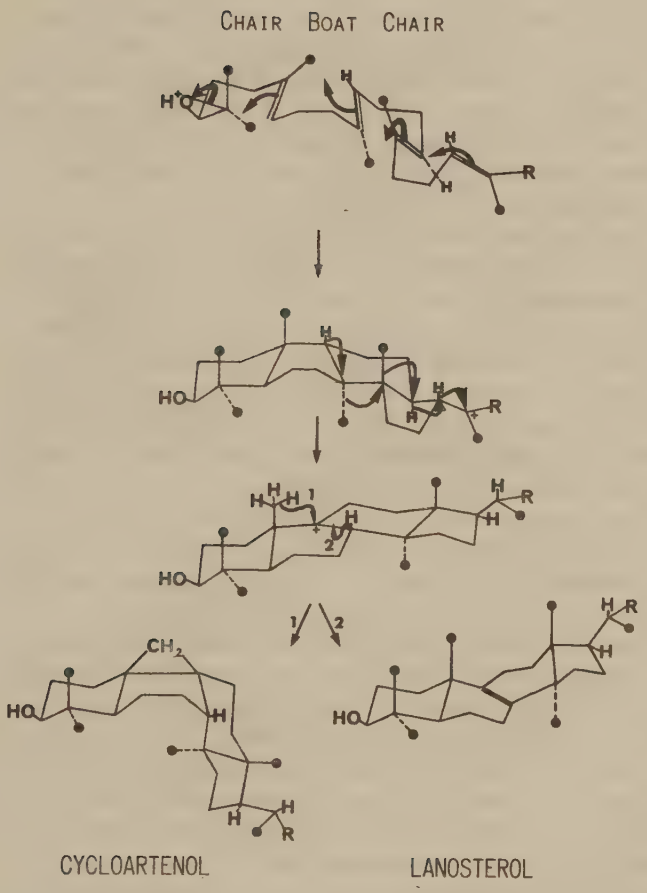


Abb. 6 : Biosynthese von Lanosterol und Cycloartenol

Ausgehend von einer "pre-chair-boat-chair"-Konformation wird das Squalenepoxid unter Protonenkatalyse zum Protosterolkation (positive Ladung am C_{20}) cyclisiert. In diesem Molekül kommt es dann zu einer Reihe von Hydridionen- und Methyl-Verschiebungen. Diese 1,2-Verschiebungen (Wagner-Meerwein-Umlagerungen) setzen eine coplanare und trans-ständige Anordnung der beteiligten Gruppen voraus. Endstufe dieser Umlagerungen bildet ein weiteres Kation (positive Ladung am C_9), das durch Protonenverlust in Lanosterol (Weg 2) bzw. Cycloartenol (Weg 1) umgewandelt wird (RICHARDS & HENDRICKSON, 1964; MANITTO, 1981; VAN TAMELEN, 1982).

liegt das Squalen im Enzym in der thermodynamisch begünstigten "all-prechair"-Konformation vor, während es für die Epoxysqualencyclase-Reaktion in eine "pre-chair-boat-chair"-Konformation gebracht werden muß. Diese thermodynamisch ungünstigere Konformation erfordert eine stärkere Wechselwirkung des Enzyms mit seinem Substrat (OURISSON et al., 1979b).

Auch in der Substratspezifität wird der primitivere Charakter der Squalencyclasen deutlich:Diese setzen in Rohhomogenaten von *Acetobacter rancens* bzw. *Acetobacter pasteurianum* in vitro nicht nur Squalen in Diplopterol und Hopen um, sondern cyclisieren auch beide Stereoisomeren von 2,3-Oxidosqualen, und zwar zu 3α- und 3β-Hydroxy-Hopen und -Diplopterol (ANDING et al., 1976; ROHMER et al., 1980a). Die Epoxysqualencyclasen akzeptieren i.A. ausschließlich das 2,3-S-Oxidosqualen (BARTON et al., 1975), doch gibt es auch einige wenige Beispiele geringerer Substratspezifität, Beispiele, die vielleicht evolutionäre Übergangsformen zwischen Squalen- und Epoxysqualencyclase darstellen:

So synthetisiert das Protozoon *Tetrahymena pyriformis* in Abwesenheit exogener Sterole in protonenkatalysierter Reaktion das hopanoidähnliche Tetrahymanol (Abb.7A) und wenig Diplopterol (CASPI et al., 1968; ZANDER et al., 1970), kann aber in vitro auch beide Epoxysqualen-Isomeren zu den entsprechenden 3α- und 3β-Hydroxyderivaten umsetzen (BOUVIER et al., 1980). Interessanterweise reprimiert *Tetrahymena* seine Triterpenoid-Biosynthese, sobald exogen Sterole angeboten werden, ein Zeichen für gleiche Funktionalität beider Stoffe und für den Beginn hormonähnlicher Wirkungsweise von Sterolen (MALLORY & CONNOR, 1971).

Das Bakterium *Methylococcus capsulatus* stellt den ungewöhnlichen Fall dualer Biosynthese von Hopanoiden und Sterolen (hier: 4-Methylsterole) dar. Wie in vitro in zellfreien Homogenaten bewiesen werden konnte, coexistieren in diesem Prokaryonten eine Squalencyclase, die Squalen in Diplopterol und Hopen und Epoxysqualen in die ent-

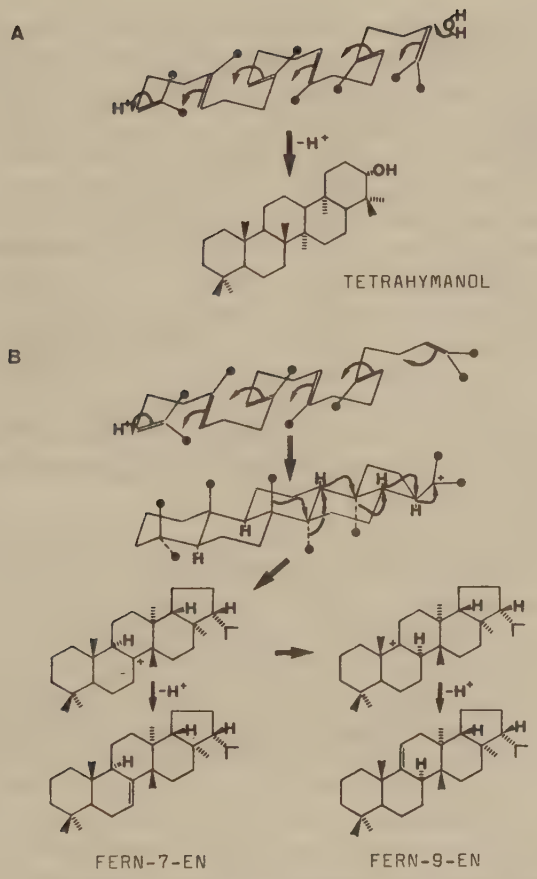


Abb. 7 : Biosynthese von Tetrahymanol (A) und Fernen (B)

A : Anaerobe, protonenkatalysierte Cyclisierung von Squalen - ausgehend von einer "all-prechair"-Konformation - zu Tetrahymanol in *Tetrahymena pyriformis* (MALLORY et al., 1968).

B : Anaerobe, protonenkatalysierte Squalencyclisierung in *Polypodium vulgare*: Das entstandene Kation wird nach einer Reihe von 1,2-Umlagerungen durch Protonenverlust in Fern-7-en bzw. Fern-9-en umgewandelt (BARTON et al., 1971).

sprechenden 3α- und 3β-Hydroxy-Derivate überführt, und eine Epoxysqualencyclase, die neben ihrem physiologischen Substrat auch das 3-R-Isomere von Oxidosqualen umsetzen kann (ROHMER et al., 1970b).

Eine ähnliche Entwicklungsstufe zwischen Squalen- und Epoxysqualencyclase wurde im Farn *Polypodium vulgare* beschrieben. Neben einer normalen oxidativen Phytosterolbiosynthese wird dort Squalen anaerob nicht in protonenkatalysierter Reaktion direkt in Hopanoide (Hop-22(29)-en, Hop-16(17)-en, Hop-13(18)-en), sondern auch unter Hydrid- und Methylgruppen-Verschiebungen zu Fernen cyclisiert (Abb.7B; BARTON et al., 1971).

Ein Beispiel für eine anaerobe neben einer aeroben Cyclisierung innerhalb eines Moleküls stellt die Biosynthese von Ironvorläufern in einer Irisart dar (JAENICKE,L., pers. Mitteilung).

Die Entwicklung von der Squalen- zur Epoxysqualencyclase setzt demnach eine Veränderung des aktiven Zentrums im Enzym voraus. OURISSON et al. (1979b) postulieren für die Evolution von Hopanoid- (Abb.8a) zu Tetrahymanol-Biosynthese (Abb.8b) eine kleine, möglicherweise durch den Austausch nur einer Aminosäure zu verwirklichende, Lageveränderung des nucleophilen Zentrums N_1, wobei N_1 vielleicht durch ein H_2O-Molekül repräsentiert wird. Die weiteren Schritte zur Epoxysqualencyclase (Abb.8c) bedingen eine zusätzliche Verlagerung dieses nucleophilen Zentrums, um das Ende des aus Squalen vorgeformten neuen Tetracyclus' zu binden. Damit das Squalen in eine "pre-chair-boat-chair"-Konformation gezwungen wird, werden zusätzliche Änderungen der Form der Substratbindungsstelle vorgeschlagen. Dabei soll ein Zwischenprodukt über das C_9 des Sterols an ein weiteres nucleophiles Zentrum, N_2, gebunden und das H an C_8 durch durch ein neues basisches Zentrum, B, eliminiert werden (OURISSON et al., 1979b).

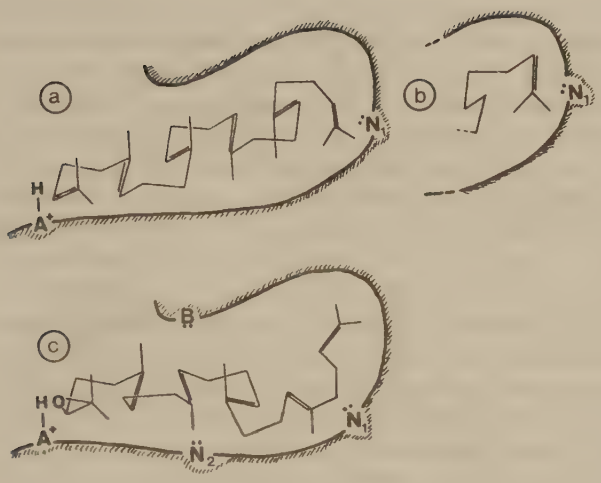


Abb. 8 : Strukturveränderungen im aktiven Zentrum des Enzyms bei der Evolution der Squalen- zur Epoxysqualencyclase

Die Abbildung zeigt die von OURISSON et al. (1979b, 1982) vorgeschlagenen Strukturveränderungen, die die Squalen-Hopen-Cyclase (a) während der Evolution zur Squalen-Tetrahymanol-Cyclase (b) und schließlich zur Epoxysqualen-Lanosterol-Cyclase (c) erfahren haben könnte.

Die vorliegende Arbeit beschreibt ein Squalen cyclisierendes Enzym aus *Bacillus acidocaldarius*. Dieses gram-positive, sporenbildende Bakterium wurde zuerst aus heißen Quellen isoliert (DE ROSA et al.,1971; DARLAND & BROCK,1971; UCHINO & DOI, 1976) und zeigt optimales Zellwachstum bei pH 3-4 und 60-65 °C (DARLAND & BROCK; 1971). Vertreter der gleichen Spezies konnte inzwischen auch aus Gartenböden (HIPPCHEN et al., 1981) und Fruchtsaft (CERNY et al., 1984) isoliert werden.

Wahrscheinlich in Anpassung an die extremen Lebensbedingungen, enthält die Cytoplasmamembran von *Bacillus acidocaldarius* einige ungewöhnliche Lipide (LANGWORTHY & MAYBERRY,1976), die die Aufrechterhaltung des intrazellulären, nahezu neutralen pHs begünstigen (pH 6; OSHIMA et al., 1977; KRULWICH et al., 1979). Der hohe Anteil an Glykolipiden (64% der Gesamtlipide) besteht neben Mono- und Diacylglyceriden mit verschiedenen Zuckerresten (insgesamt ca. 66% der Glykolipide) zu etwa 30% aus Hopanglykolipid (1-O-(N-Acylglucosaminyl)-2,3,4,-tetrahydroxypentan-29-hopan) und "Tetrol" (1,2,3,4-Tetrahydroxypentan-29-hopan). Unter den sauren Lipiden (20% der Gesamtlipide) ist vor allem das zu 43% gefundene Sulfonolipid (Sulfonoglycosyldiacylglycerol) ungewöhnlich, das sonst nur in photosynthetischen Organismen vorkommt. In der Neutrallipidfraktion wurden u.a. Hopen und Squalen identifiziert (DE ROSA et al., 1973).

Neben den bei *Bacilli* üblichen iso- und anteiso-verzweigten Fettsäuren mit 15 bis 17 C-Atomen (32% der Fettsäuren in *B.a.*) enthält *Bacillus acidocaldarius* zu 65% C_{17}- und C_{19}-ω-Cyclohexanfettsäuren (Werte für Wachstum bei pH 3 und 60 °C; DE ROSA et al., 1971; LANGWORTHY et al., 1976). In physikochemischen Untersuchungen an Modellmembranen zeigten die ω-Cyclohexanfettsäuren, wie auch die Hopanoide, eine membranverfestigende Wirkung, während die verzweigtkettigen Fettsäuren fluidisierend wirkten (KANNENBERG et al., 1980,1983; PORALLA et al., 1980; BENZ et al., 1983; KANNENBERG, 1983).

Die verminderte Fähigkeit von *Bacillus acidocaldarius*-Mutanten mit Defekt in der Biosynthese der Cyclohexanfettsäuren, ohne Supplementierung des Mediums mit Cyclohexancarbonsäuren unter extremen Wachstumsbedingungen zu wachsen (KRISCHKE, pers. Mitteilung), deutet auf eine wichtige Rolle der cyclischen Fettsäuren für die Stabilität der Membran hin.

Daß *Bacillus acidocaldarius* die Zusammensetzung seiner Lipide wechselnden Wachstumsbedingungen anpassen und

so u.U. die Permeabilität und Fluidität seiner Zellmembran regulieren kann, konnten PORALLA et al. (1984) zeigen. In manchen pH-Bereichen konnte bei Erhöhen der Temperatur eine Steigerung des Gehalts an Cyclohexanfettsäuren festgestellt werden (K. PORALLA, pers. Mitteilung). Der Gehalt an Hopanglykolipid reagierte kaum auf pH-Änderungen, verfünffachte sich jedoch bei Erhöhen der Wachstumstemperatur von 60 auf 65 °C (PORALLA et al., 1984).

Beschränkten sich die bisherigen Untersuchungen an Squalen cyclisierenden Enzymen auf den Vergleich der Cyclisierungsmechanismen und der Substratspezifität, so war es Aufgabe der vorliegenden Arbeit, ein solches Enzym - die Squalencyclase aus *Bacillus acidocaldarius* - erstmals näher zu charakterisieren, um seine Eigenschaften mit denen der Epoxysqualencyclasen zu vergleichen. Im Vordergrund stand hier zunächst die Entwicklung und Optimierung eines Enzymtests, woran sich Untersuchungen der Enzymeigenschaften (Lokalisation, Stabilität, Hemm- und Aktivierbarkeit des Squalenumsatzes) anschließen sollten. Nach Reinigung des Enzyms waren für einen späteren Zeitpunkt Untersuchungen zum Verwandschaftsgrad von Squalen- und Epoxysqualencyclasen mit Hilfe immunochemischer (Kreuzreaktion von Antikörpern gegen die Squalencyclase mit Epoxysqualencyclasen) und proteinchemischer Methoden (Aminosäurezusammensetzung und -sequenz) angestrebt. Daneben lag auch besonderes Interesse in der Frage, ob und wie die Enzymmenge in der Zelle in Antwort auf veränderte Wachstumsbedingungen reguliert wird.

II. MATERIALIEN UND METHODEN

1. MATERIALIEN

Das Tritium-markierte Squalen (4,8,12,17,21-[^{3}H]-Squalen) wurde von NEN, Dreieichenhain, bezogen , die Szintillationsflüssigkeiten waren von ZINSSER,Frankfurt/Main.

SERVA, Heidelberg, lieferte die Säulenmaterialien Servachrom XAD 2, Servacel DEAE 23 SH, DOWEX WX8, OV 1, sowie folgende Chemikalien: Acrylamid, Ammoniumpersulfat, AMO 1618, Glycin, ß-Mercaptoethanol, N,N'-Methylen-Bisacrylamid, Natriumdeoxycholat, Serva Blau R 250, SDS, N,N',N,N'-Tetramethylethylendiamin, Triton X-100, Tween 80.

Diethylpyrocarbonat, Dithiothreitol, Florisil, Lysozym, Myrcen, N-Ethylmaleimid, p-Chlormercuribenzolsulfonsäure, Phenylmethylsulfonylfluorid, Natriumtaurodeoxycholat, Triethanolamin (Hydrochlorid), Tween 20, sowie Rinderserumalbumin (BSA), die Enzymsubstrate für den Immunoblot und das Squalen wurden von SIGMA, München, bezogen,

DIFCO, Detroit (Michigan,USA) lieferte Bacto-Yeast Extract und Bacto-Agar, MAIZENA, Heilbronn, Glukose. Dr. L. Vértesy, HOECHST,Frankfurt/Main, stellte Hop-22(29)-en zur Verfügung. ROTH, Karlsruhe, lieferte das Berberinchlorid. Die Eichproteine für die Molekulargewichtsbestimmung wurden über BOEHRINGER, Mannheim, bezogen, 5-Sulfosalicylsäure über FLUKA, Neu-Ulm, Sephadex G 100 über PHARMACIA, Freiburg.

Die Vergleichssubstanz für Diplopterol wurde von Herrn Thomas Härtner aus *Methylobacterium organophilum* isoliert und gereinigt (Vorschrift vergl. KANNENBERG, 1983); massenspektrometrische Untersuchung der Substanz deutet auf eine zusätzliche Methylgruppe, wahrscheinlich am C_6.

Alle weiteren nicht näher aufgelisteten Chemikalien wurden über MERCK, Darmstadt, bezogen.

Alle Chemikalien waren, soweit erhältlich, analysenrein; alle Lösungen (Ausnahme:Kulturmedien) wurden mit bidest. Wasser angesetzt.

2. METHODEN

2.1. ANZUCHT VON BACILLUS ACIDOCALDARIUS

Bacillus acidocaldarius, Stamm 104-IA (Dr. T. D. Brock) wurde bei 50 °C in Sporulationsmedium (DARLAND & BROCK, 1971), pH 3.5 folgender Zusammensetzung gezogen:

0.2	g/l	$(NH_4)_2SO_4$
0.5	g/l	$MgSO_4 \times 7\ H_2O$
0.25	g/l	$CaCl_2 \times 2\ H_2O$
3	g/l	KH_2PO_4
1	g/l	Glukose
2	g/l	Hefeextrakt
2	g/l	lösliche Stärke
0.28	mg/l	$FeSO_4 \times 7\ H_2O$
1.25	mg/l	$MnCl_2 \times 4\ H_2O$
0.4	mg/l	$ZnCl_2 \times 7\ H_2O$

Für Belüftung der Kulturen sorgte Schütteln in 500ml-Schikanekolben (100ml Schüttelkulturen, 120 upm) bzw. 33.3 l Luftdurchsatz / min von 10 - 15 l gerührten Standkulturen im 20l-Fermenter (Modell C 6, Biolafitte). Die Zellen wurden während ihrer logarithmischen Wachstumsphase ($OD_{\lambda=578nm}$ ca. 0.8 - 1.5) geerntet, durch niedertourige Zentrifugation (3000g, 10 min; Sorvall RC 2-B) sedimentiert und bei -20 °C tiefgefroren oder direkt weiterverarbeitet.

2.2. SQUALENCYCLASE-ENZYMTEST

2.2.1. Aufarbeitung der *Bacillus acidocaldarius*-Zellen

2.2.1.1. Lysozym-Behandlung

In Abwandlung der Protoplastisierungsmethode nach KABACK (1970) wurden *B.a.*-Zellen zweimal in Lysepuffer (100 mM Kaliumphosphat, pH 7.4, mit 20% Sucrose) ge-

waschen und anschließend zu 10 bis 20 mg nasse Zellen je ml Lysepuffer resuspendiert. Nach Zugabe von Lysozym (Endkonzentration 1 mg/ml) wurden sie 30 bis 60 min bei 37 °C unter gelegentlichem Schütteln inkubiert. Die Vollständigkeit der Protoplastenbildung wurde durch Abnahme der optischen Dichte bei 578 nm (Eppendorf 1101 M) bei 1:1000-Verdünnung in entionisiertem Wasser im Vergleich zu der gleichen Verdünnung in Lysepuffer überprüft; mikroskopisch konnten keine abgerundeten Zellformen beobachtet werden. Die Protoplasten wurden sedimentiert (Heraeus Christ, Minifuge GL 4400; 4000 upm, 10 min) und in 100 mM Kaliumphosphat, pH 7.4, 20% Sucrose, auf Squalencyclase-Aktivität getestet.

2.2.1.2. Ultraschall-Behandlung

Bacillus acidocaldarius-Zellen wurden mehrmals im jeweiligen Testpuffer gewaschen und zu 30 bis 300 mg nasse Zellen / ml Puffer resuspendiert,bevor sie - gekühlt durch ein Eis/Wasser-Bad - durch 2- bis 3-maliges 3-minütiges Beschallen (Branson Sonofier B 12) bei ca. 30 Watt (Mikrospitze, Stufe 7) homogenisiert wurden.

2.2.2. Herstellung der [^{3}H]-Squalen-Stammlösung

Für die Standardinkubation wurde eine 10fach konzentrierte, 500 µM [^{3}H]-Squalen-Stammlösung in 10 mM Testpuffer (vergl.2.2.3.) mit 1 mg/ml Triton X-100 und einer spezifischen Radioaktivität von ca. 37 MBq/mmol (1 mCi/mmol) benötigt. Dazu wurden unmarkiertes Squalen und [^{3}H]-Squalen aus n-Hexan unter Stickstoff eingedampft, der Rückstand wurde in 10 mM Testpuffer mit 1 mg/ml Triton X-100 resuspendiert. (Wegen der hohen spezifischen Radioaktivität des markierten Squalens (147 - 733 GBq/mmol = 4 - 20 Ci/mmol) konnte die Veränderung der Squalenkonzentration durch Zugabe des radioaktiv markierten Stoffes vernachlässigt werden.) Zur besseren Emulgierung des wasserunlöslichen Squalens wurde die Suspension einige Minuten im Ultraschallbad (Bransonic 221) beschallt. Die Voll-

ständigkeit der Emulgierung wurde durch Flüssigszintillationszählung (Packard Tricarb Modell 3385, Beckmann LS 6800 oder Kontron MR 300) eines Aliquots der Suspension in 10 ml Unisolve I überprüft.

Die [^{3}H]-Squalenstammlösung wurde am jeweiligen Versuchstag aus den bei -20 °C gelagerten Squalen- und [^{3}H]-Squalen-Lösungen in n-Hexan und dem tritonhaltigen Puffer, in den das Triton X-100 frisch eingewogen worden war, angesetzt. (Das jeweils frische Ansetzten des detergenzhaltigen Puffers ist notwendig, da in Lösungen von Polyoxyethylenether-Detergenzien beim Stehenlassen oxidierende, SH-reaktive Agenzien entstehen (CHANG & BOCK, 1980).) Stammlösungen anderer Tritonkonzentrationen und für [^{3}H]-Hopen und [^{3}H]-Diplopterol wurden analog hergestellt.

2.2.3. Standardinkubation

Der Squalencyclase-Test für das Enzym aus *Bacillus acidocaldarius* wurde in Anlehnung an Testsysteme für Squalen- (ZANDER et al., 1970; ROHMER et al.,1980a) und Epoxysqualencyclasen (DEAN, 1969; BEASTALL et al., 1971; SAAT & BLOCH, 1976) entwickelt. Sämtliche Enzymtests wurden als Doppelbestimmungen durchgeführt und wurden von einer Kontrollinkubation des Squalens in Puffer ohne Enzymzusatz begleitet. Bei 30 Minuten und kürzerer Inkubationsdauer wurden die Inkubationsansätze vor dem Start der Reaktion durch Substratzugabe ca. 5 min bei 60 °C vorinkubiert. Standardinkubationen wurden in 1 ml Testvolumen bei 60 °C in 100 mM Testpuffer (Kaliumphosphat, pH 7.4 oder Natriumcitrat, pH 6) mit verschiedenem Enzymmaterial aus *B.a.* durchgeführt; die Endkonzentrationen im Test beliefen sich auf 50 µM Squalen und 0.1 mg/ml Triton X-100. Die Enzymreaktion wurde durch Zugabe des 10fach konzentrierten 500 µM [^{3}H]-Squalens (37 MBq/mmol = 1 mCi/mmol, entspr. ca. 100000 dpm/Test) gestartet und durch Abkühlen auf Eis oder direktes Ausschütteln mit organischen Lösungsmitteln gestoppt.

2.2.4. Lipidextraktion

Substrat und Reaktionsprodukte wurden durch Lipidextraktion nach HARA & RADIN (1978) in die organische Phase überführt. Dazu wurden die Inkubationsansätze mit dem doppelten Volumen (2 ml) an Hexan:Isopropanol (3:2, v/v) versetzt und kurz geschüttelt (Vortex, 3-5s). Verzögerte Phasentrennung trat nur bei hohen Proteinkonzentrationen im Test (1 mg und mehr) auf und konnte durch kurze Zentrifugation (Heraeus Christ, Minifuge GL 4400; 3000 upm, 3 min) beschleunigt werden. Die organische Phase wurde zur Trennung von Substrat und Produkten herangezogen.

2.2.5. Trennung von Substrat und Produkten

2.2.5.1. Dünnschichtchromatographische Trennung

Squalen, Hopen und Diplopterol wurden dünnschichtchromatographisch auf DC-Fertigplatten Kieselgel 60 (ohne Fluoreszenzindikator, Schichtdicke 0.25 mm; Merck, Darmstadt)nach quantitativem Auftrag der eingeengten (Exsiccator), mit Carriern versetzten (Zugabe von je ca. 10-20 µg Squalen, Hopen und Diplopterol je Probe) organischen Phase getrennt. Die Chromatogramme wurden in zwei Stufen entwickelt: a) Entwicklung in Chloroform, 1/3 Laufstrecke, b) Entwicklung in n-Hexan, 1/1 Laufstrecke.

Für die Identifizierung der Cyclisierungsprodukte wurde ein zweites Dünnschichtchromatographie-System herangezogen: Dazu wurden die Kieselgel 60-Platten mit Silbernitrat imprägniert, indem sie kurz in eine 2.5%ige (w/v), wässrige $AgNO_3$-Lösung getaucht wurden (KATES, 1982). Nach Auftragen der Proben auf die getrockneten Platten wurden die Chromatogramme in Chloroform entwickelt.

Die Triterpene wurden durch Anfärben mit Berberinchlorid (Lösung ca. 10 µg/ml in Ethanol:Wasser (95:5, v/v)) im langwelligen UV sichtbar und konnten anhand mitgelaufener Referenzsubstanzen identifiziert werden.

2.2.5.2. (Radio-) Gaschromatographische Trennung

Substrat und Produkte konnten gaschromatographisch an OV 1 (3 %ige Beladung von Gaschrom Q, 100-200 mesh; Säulenlänge ca. 1.8 m) getrennt und per Flammenionisation detektiert werden. Gaschromatographische Trennungen wurden an einem Hewlett-Packard Gaschromatographen unter folgenden Bedingungen durchgeführt: isothermer Lauf (270 oder 280 °C) oder Temperaturprogramm (180-300 °C, 4 °C/min) bei Heizen des Injektors und Detektors auf 300 °C, einem Trägergas-Durchfluß von 25 ml N_2/min und Zufuhr von 25 ml H_2/min und 300 ml Luft/min am Flammenionisationsdetektor.

Radiogaschromatographische Trennungen erfolgten an einem Erba Fractovap-Gaschromatographen (Modell 2101) in Verbindung mit einem Radiogasdetektor (Perkin Ellmer), wobei die auf der OV 1-Säule im isothermen Lauf (270 °C) getrennten Substanzen in einem Splitverhältnis von etwa 45 zu 55 zwischen Flammenionisations- und Radiogasdetektor aufgeteilt wurden. Bei einem Trägergasfluß von 36 ml H_2/min wurden am Flammenionisationsdetektor, der wie der Injektor auf 300 °C geheizt wurde, ca. 350 ml Luft/min und weitere 9 ml H_2/min zugeführt. Der zum Radiodetektor geleitete Anteil der getrennten Substanzen wurde nach reduktivem Cracken in dem auf 680 °C geheizten Reaktor im Gaszählrohr als [^{3}H]-Methan gezählt (Zählrohr auf 140 °C geheizt, Einstellung auf 2700 Volt Spannung und Zuspeisen von 10 ml Methan/min).

Bei radiogaschromatographischen Trennungen konnte nur ein Bruchteil der nach der Enzymreaktion erhaltenen, eingeengten organischen Phase (ca. 2 µl von insgesamt 20-50 µl Probe) in den Chromatographen eingespritzt werden. Um die untersuchten Substanzen dennoch gut im Flammenionisationsdetektor erkennen zu konnen, wurden je ca. 1 µg Squalen, Hopen und Diplopterol zugefügt.

Nach gas- bzw. radiogaschromatographischer Trennung der Substanzen konnte ihr Mengenverhältnis direkt durch Integrieren des Flammenionisations- bzw. des Zählrohrsignals erhalten werden.

2.2.6. Quantitative Bestimmung von Substrat und Produkten nach dünnschichtchromatographischer Trennung

2.2.6.1. Radio-Dünnschichtabtastung

Das Mengenverhältnis von Squalen, Hopen und Diplopterol konnte durch Abtasten der radiaktiven Dünnschichtchromatogramme mittels eines Radio-Dünnschichtscanners (Berthold LB 2723) ermittelt werden. Hierbei wurden die Chromatogramme automatisch Spur für Spur in wenigen Millimetern Abstand mit einem offenen Gaszählrohr (Fenster 10 x 4 mm) abgetastet (Vorschub 6 cm/h). Durch Integration (Wiegen der ausgeschnittenen Gipfel) der aus den Zählrohrsignalen erhaltenen Kurven wurden Substrat und Produkte quantifiziert. 1000 dpm von ^{3}H-markierter Verbindung konnten mit dieser Methode gerade noch als kleiner Gipfel in der Kurve (Höhe ca. 5 mm über dem Hintergrund, bei 10 cm entspr. 100 cpm) erkannt werden. Deshalb war bei wenig Substratumsatz besonders der Diplopterol-Gipfel nicht mehr zu erkennen.

2.2.6.2. Flüssigszintillationszählung der ausgekratzten Dünnschichtchromatographie-Flecken

Als wesentlich empfindlicher (schon 100 dpm über dem Hintergrund wurden deutlich erkannt) und genauer als die Abtastung der Dünnschichtchromatogramme durch den Radio-Dünnschichtscanner erwies sich die Flüssigszintillationszählung der ausgekratzten Dünnschicht-Flecken. Dazu wurden die Positionen der untersuchten Substanzen nach Anfärben mit Berberinchlorid, welches zu einem etwa 5-10 %igen Zählausbeute-Verlust führte (Farb-Quench), markiert und die Flecken vorsichtig mit einem angeschärften Spatel ausgekratzt. Das ausgekratzte Kieselgelpulver wurde auf ein Stück Entwurfpapier überführt und vorsichtig in ein Szintillationsfläschchen gefüllt. Nach Zugabe von ca. 4 ml Szintillator (Quickszint 501) wurde die Radioaktivität der Proben im Flüssigszintillationszähler (Geräte vergl. 2.2.2.) bestimmt. Nach Abzug der im Kontrollver-

such (Squaleninkubation ohne Enzymzusaz) ermittelten Hintergrundwerte für Hopen und Diplopterol - verursacht durch radioaktive Verunreinigungen des [^{3}H]-Squalens - wurden die Werte für den enzymatischen Squalenumsatz errechnet und Mittelwerte aus den Doppelbestimmungen ermittelt.

2.3. Massenspektrometrische Produktidentifizierung

Für die massenspektrometrische Identifizierung der Cyclisierungsprodukte wurden größere Mengen dieser Stoffe gewonnen, indem tritonfreies Membransolubilisat von *B.a.* (ca. 2.8 mg Protein) mit ca. 20 mg Squalen und ca. 0.9 mg Triton X-100 in 0.1 M Natriumcitrat-Puffer, pH 6, bei 50-60 °C bis zu etwa 15 %igem Substratumsatz inkubiert wurde (Inkubationsvolumen 3 ml, ca. 4 Wochen Inkubationsdauer). Die Reaktionsprodukte wurden nach dem Standardverfahren ausgeschüttelt, dünnschichtchromatographisch getrennt und mit Chloroform aus den ausgekratzten Substanzflecken im Kieselgel extrahiert. Die Extrakte wurden unter Stickstoff eingedampft und bei -20 °C gelagert.

Zur massenspektrometrischen Untersuchung wurden die Produkte jeweils in Chloroform gelöst. Die zu untersuchenden Substanzen wurden jeweils gaschromatographisch (Temperaturprogramm: 20 bis 300 °C; dabei 5 °C/min zwischen 20 und 150 °C und 10 °C/min zwischen 150 und 300 °C) auf einer SE 54 -Kapillarsäule (Carlo Erba Spectrovap 2900) von geringfügigen Verunreinigungen getrennt und per Splitter zum Massenspektrographen (Varian Mat 112 S) geleitet, wo sie durch Elektronenstoß bei 80 eV ionisiert wurden.

2.4. Anreicherung der Squalencyclase

2.4.1. Membranpräparation

2.4.1.1. Zellaufschluß

Logarithmisch gewachsene, frische oder eingefrorene (-20 °C) *Bacillus acidocaldarius*-Zellen wurden mehrmals in Tris/HCl-Puffer, pH 8, gewaschen und zu ca. 100 mg nasse Zellen/ml im gleichen Puffer resuspendiert. Wurde anschließend eine enzymatische Protoplastisierung mit Lysozym (0.1 mg/ml nach OSBORN et al., 1972; 1-2 h Rühren bei Raumtemperatur) durchgeführt, so enthielt der Puffer zur Stabilisierung der Protoplasten 0.75 M Sucrose. Protoplasten oder ganze Zellen wurden in Portionen zu maximal 250 ml unter Eis/Wasser-Kühlung jeweils 3-4 mal 3 min bei ca. 45 Watt beschallt (Branson Sonifier B 12, große Spitze, Stufe 10).

Alle weiteren Schritte zur Anreicherung der Squalencyclase wurden - soweit nicht anders angegeben - bei 4 °C (d.h. auf Eis oder im Kühlraum) durchgeführt.

2.4.1.2. Differentielle Zentrifugation

Nach Entfernen von restlichen ganzen Zellen, ganzen Protoplasten und großen Zelltrümmern durch niedertourige Zentrifugation (1500 g, 15 min; Sovall RC 2-B) wurden die Membranen durch Ultrazentrifugation (105000 g, 1.5-2 h; Kontron TGA 75) vom cytosolischen Überstand befreit. Das Sediment wurde durch mehrmaliges Resuspendieren in ca. 10fachem Pelletvolumen in 10 mM Natriumcitrat, pH6, und wiederholtes Rezentrifugieren 3- bis 4-mal gewaschen und schließlich zu ca. 12 mg Protein/ml im gleichen Puffer aufgenommen.

2.4.2. Solubilisierung der Squalencyclase

Die Membranen in 10 mM Natriumcitrat-Puffer, pH 6, (ca. 12 mg/ml Protein) wurden bei Raumtemperatur schnell

mit gleichem Volumen von 3.5 mg Triton X-100/ml im selben Puffer versetzt (sorfortiges Durchmischen durch kurzes Vortexen) und 30 min bei 60 °C inkubiert. Unter diesen Solubilisierungsbedingungen (ca. 0.3 mg Triton X-100 je mg Membranprotein) konnte die Squalencyclase reproduzierbar zu 80-90 % von der Membran abgelöst werden. Durch anschließende Ultrazentrifugation (105000 g, 1.5 h bei Raumtemperatur) wurde das solubilisierte Enzym von der Restmembran getrennt.

2.4.3. DEAE-Cellulose-Chromatographie

2.4.3.1. Vorbereitung des Säulenmaterials (COOPER, 1981)

DEAE-Cellulose (Servacel DEAE 23 SH) wurde in 15fachem Volumen (v/w) 0.5 M Salzsäure suspendiert. Nach 30minütigem Stehen wurde das Harz säurefrei gewaschen (H_2O) und weitere 30 min mit gleichem Volumen 0.5 M NaOH behandelt. Anschließend wurde es erneut bis zur Neutralität mit Wasser gewaschen, 30 min in 10 mM EDTA-Lösung inkubiert und erneut gewaschen. Dann wurde die DEAE-Cellulose in verdünnter Citronensäure aufgenommen, unter Vakuum entlüftet (Saugflasche) und am pH-Meter mit Natriumcitrat auf pH 6.5 eingestellt. Nach Entfernen feinster Säulenmaterialpartikel ("fines") durch Abgießen der über dem abgesetzten Harz befindlichen Flüssigkeit und erneutem Entlüften wurde das Harz in eine Säule gefüllt (ca. 0.5 ml Harz je mg aufzutragendes Protein) und solange mit Säulenpuffer (10 mM Natriumcitrat, pH 6.5, 1 mg/ml Triton X-100) gewaschen, bis das Eluat die gleiche Ionenstärke (Leitfähigkeitsmeßgerät: Radiometer Typ CMD 2 f) aufwies wie der Säulenpuffer.

2.4.3.2. DEAE-Chromatographie der Squalencyclase

Das Triton X-100-Solubilisat der Membran in detergenzhaltigem 10 mM Natriumcitrat-Puffer wurde durch vorsichtige Zugabe von verdünnter NaOH von pH 6 auf pH 6.5 gebracht und anschließend auf die mit Säulenpuffer (s.o.)

equilibrierte DEAE-Cellulose-Säule aufgetragen (je mg aufzutragendes Protein ca. 0.5 ml Säulenvolumen). Nach Waschen mit zweifachem Säulenvolumen Puffer wurde die Squalencyclase mittels 4fachem Säulenvolumen eines linearen NaCl-Gradienten (0-200 mM NaCl in Säulenpuffer) eluiert. Die Säule wurde anschließend mit 2fachem Säulenvolumen 0.5 M NaCl in Säulenpuffer nachgewaschen. Fraktionen à 10 ml (Probenauftrag, Waschen und 0.5 M NaCl-Stufe) bzw. à 2 ml (NaCl-Gradient) wurden gesammelt und auszugsweise auf Proteingehalt, Squalencyclase-Aktivität und Leitfähigkeit untersucht. Fraktionen höchster Squalencyclase-Aktivität wurden vereinigt und weiterverarbeitet.

2.4.4. Ultrafiltration

Die vereinigten DEAE-Fraktionen höchster Squalencyclase-Aktivität wurden vor Entfernen des nicht gebundenen Detergenz' durch Ultrafiltration (Amicon Ultrafiltrationszelle Modell M 12, Amicon Membranfilter YM 2, Ø 25 mm) auf ca. 1 ml Volumen konzentriert. Umgekehrte Reihenfolge - d.h. Detergenzentfernung vor Konzentrieren der Probe- hatte den Nachteil, daß durch die größeren Mengen an benötigtem XAD-Harz mehr Protein bei der hydrophoben Chromatographie verloren ging.

2.4.5. XAD-Chromatographie

Viele Detergenzien können durch hydrophobe Chromatographie an Polystyrol-Divinylbenzol-Copolymeren aus Lösungen entfernt werden (FURTH, 1980). Die ursprünglich von HALLOWAY (1973) beschriebene Methode zur Entfernung von Triton X-100 an Bio-Beads SM 2 wurde von CHEETHAM (1979) auf Amberlite XAD 2 übertragen. Dabei lag die Maximalkapazität für Triton X-100 bei 0.3 g Detergenz je g trockenes XAD-Harz.

Um eine möglichst quantitative Detergenzentfernung zu erreichen, wurde zur Chromatographie der Proben ein ca. 50- bis 100-facher Überschuß an Servachrom XAD 2 eingesetzt. Das Harz wurde nach mehrmaligem Waschen mit Puffer (Natriumcitrat, pH 6.5 bei Chromatographie von DEAE-angereichertem Enzym; 10 mM Natriumcitrat, pH 6 bei Detergenzentfernung nach Triton-Solubilisierung der Membran) in der Probe resuspendiert und ca. 15 min leicht geschüttelt. Die Suspension wurde über eine Nutsche abgesaugt, das Harz wurde mit ca. 1.5- bis 2fachem Volumen des gleichen Puffers gewaschen. Probe und Waschelуat wurden vereinigt. Die häufig auftretende Trübung der Probe, vermutlich verursacht durch nach Detergenzentfernung erfolgte Reassoziation der Lipide zu Lipidvesikeln, konnte durch Ultrazentrifugation (105000 g, 2 h) ohne nennenswerten Aktivitätsverlust der Squalencyclase im Zentrifugationsüberstand (ca. 3 %) sedimentiert werden.

2.4.6. Gelfiltration an Sephadex G 100

2 ml des durch DEAE-Chromatographie angereicherten, detergenzfreien (XAD-Chromatographie mit anschließendem Ultrazentrifugationsschritt), konzentrierten (Ultrafiltration) Enzyms wurden in 0.1 M Natriumcitrat, pH 6.5, einer Gelfiltration an Sephadex G 100 unterworfen (Säulenvolumen ca. 135 ml; Säule ca. 78 cm x Ø 1.5 cm; Flußrate ca. 15 ml/h). Fraktionen à 2 ml wurden gesammelt und auszugsweise auf Squalencyclase-Aktivität und Proteingehalt untersucht.

2.5. SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese

2.5.1. Probenvorbereitung

Die Proben wurden vor dem Auftragen auf ein diskontinuierliches SDS-Polyacrylamid-Gel in SDS-haltigem Puffer 5-10 min im kochenden Wasserbad denaturiert. Dazu wurden sie mit soviel 5fach konzentriertem Probenpuffer

versetzt, daß die Endkonzentrationen bei folgenden Werten lagen : 65 mM Tris/HCl, pH 6.8, 4% SDS, 10% v/v Glycerin, 10% v/v ß-Mercaptoethanol, 0.1 mg/ml Bromphenolblau (LAEMMLI, 1970).

2.5.2. Diskontinuierliches SDS-Polyacrylamid-Gel

Die diskontinuierlichen Elektrophorese-Gele wurden nach RUDOLPH & KRUEGER (1979) zwischen zwei durch 2% Agar abgedichteten Glasplatten in einer Dicke von ca. 1.2 mm gegossen (Breite ca. 15 cm, Länge des Gels ca. 13 cm, davon ca. 2 bis 2.5 cm Sammelgel). Trenngel und Sammelgel hatten folgende Zusammensetzung (BLAICH, 1978):

Trenngel:	10	%	Acrylamid (w/v)
	0.15	%	N,N'-Methylenbisacrylamid (w/v)
	0.03	%	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (w/v)
	0.07	%	Ammoniumpersulfat (w/v)
	0.2	%	Natriumdodecylsulfat (SDS; w/v)
	375	mM	Tris/HCl, pH 8.8
Sammelgel:	3	%	Acrylamid (w/v)
	0.25	%	N,N'-Methylenbisacrylamid (w/v)
	0.06	%	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (w/v)
	0.07	%	Ammoniumpersulfat (w/v)
	0.2	%	Natriumdodecylsulfat (SDS; w/v)
	125	mM	Tris/HCl, pH 6.8

Vor Zugabe von Tetramethylethylendiamid (TEMED) und Ammoniumpersulfat wurden die Gelmischungen jeweils gründlich entlüftet (Rühren in der Saugflasche unter Vakuum). Zum Polymerisieren des Trenngels wurde dieses nach dem Gießen vorsichtig mit bidest. Wasser überschichtet.

2.5.3. Elektrophoreselauf

Die polymerisierten Gele wurden in einer vertikalen Elektrophorese-Apparatur (RUDOLPH & KRUEGER, 1979) nach Einfüllem der Proben in die Sammelgel-Taschen ca. 1.5 h bei 15 mA (Sammelgel) und ca. 3 h bei maximal 150 V bzw.

25 mA (Trenngel) gefahren (Elektrophoresepuffer: 25 mM Tris , 192 mM Glycin, 0.1% SDS; pH ca. 8.8). Zur Molekulargewichtsbestimmung wurden in einer Spur Molekulargewichtsmarker elektrophoretisiert (je ca. 3-5 µg: Katalase mit M_r=62000 je Untereinheit, Rinderserumalbumin (BSA) mit M_r=68000, Ovalbumin mit M_r=46000, Carboanhydrase mit M_r= 31000, Trypsin-Inhibitor mit M_r=22000).

2.5.4. Färben, Entfärben und Trocknen der Gele

Die Gele wurden direkt im Anschluß an die Elektrophorese in Serva-Blau (0.25% w/v Serva-Blau R 250 in Methanol:dest.Wasser:Eisessig = 5:5:1) 2 bis 12 h gefärbt, 45 bis 60 min in Entfärber I (10% Eisessig, 50% Methanol) und 2 bis 4 h in Entfärber II (10% Eisessig, 30% Methanol) entfärbt. Anschließend wurden die Gele mit 20% Methanol / 8% Eisessig / 10% Glycerin equilibriert, gegebenenfalls photographiert und zwischen zwei in Wasser gequollenen Cellophanfolien (Kalle Einmach-Cellophan) auf eine Glasplatte gespannt im Trockenschrank bei 60-80 °C getrocknet.

2.6. Immunochemische Methoden

2.6.1. Präparation des Antigens

Die Squalencyclase wurde in oben beschriebener Weise (vergl. 2.4.) aus *Bacillus acidocaldarius*-Zellen gewonnen und durch Membranpräparation, Solubilisierung, DEAE-Chromatographie, Ultrafiltration, XAD-Chromatographie und Ultrazentrifugation angereichert. So erhaltenes Material (aus ca. 2.2g Protein im zellfreien Ultraschallhomogenat der Zellen erhielt man ca. 2.6 mg Protein nach Anreicherung der Squalencyclase) wurde quantitativ auf einem 10%igen SDS-Polyacrylamid-Gel elektrophoretisiert und wie oben beschrieben gefärbt und entfärbt. Die Bande mit M_r=75000 wurde mit einer Rasierklinge aus

dem Gel ausgeschnitten und mit 10 ml dest. Wasser in einem Teflon/Glas-Homogenisator homogenisiert. Das homogenisierte Gel wurde sedimentiert (5000g, 5 min), in phosphat-gepufferter Saline (10 mM Natriumphosphat, pH 7.4, 0.9 % NaCl) resuspendiert und in dieser Form als Antigen verwendet (TRACY et al., 1983). 2.6 mg Protein-Auftrag auf das Gel ergaben schätzungsweise 150-300 µg M_r=75000-Protein (Schätzung nach Intensität der Serva-Blau-Färbung) in insgesamt 1.5 ml Volumen (entspr. 100-200 µg Protein/ml).

2.6.2. Immunisierung

Das Antigen wurde nach Emulgieren mit gleichem Volumen Freuds kompletten Adjuvans' intradermal dorsal in ein Kaninchen (ca. 50-100 µg Protein) bzw. intraperitonal in zwei Balb c-Mäuse (ca. 15-30 µg Protein je Maus) injiziert. Die Immunisierung wurde jeweils nach 14 Tagen wiederholt, die Versuchstiere nach weiteren 10 Tagen (Kaninchen) bzw. 14 Tagen (Mäuse) geblutet (Kaninchen aus der Ohrvene, ca. 30-40 ml; Mäuse aus der Schwanzvene, ca. 300-500 µl).

2.6.3. Gewinnung der Antiseren

Das Blut wurde nach ca. 1-stündigem Stehen bei Raumtemperatur über Nacht im Kühlschrank aufbewahrt, bevor der zusammengeklumpte Blutkuchen abzentrifugiert wurde (5000 g, 5 min). Das Serum wurde durch Abdekantieren gewonnen und portionsweise bei -20 °C eingefroren.

2.6.4. Test der Antiseren

2.6.4.1. Test auf Hemmung der Squalencyclase-Aktivität

Um störende Serumbestandteile zu entfernen, wurden die Seren durch 30-minütige Inkubation bei 56 °C inaktiviert (JOHNSTONE & THORPE, 1982). Ausgefallene Proteine wurden sedimentiert (Eppendorf-Tischzentrifuge; 10 min)

und so von den gelöst bleibenden Immunglobulinen getrennt. Tritonfreies Membransolubilisat wurde 45 min mit den inaktivierten Antiseren vorinkubiert (Antiserum-Verdünnung für die Vorinkubation: 1:2 beim Kaninchen-Serum; 1:15 bei den Mäuse-Seren); Kontrollen mit Kaninchen-Präimmunserum bzw. Maus-Normalserum. Danach wurden die Proben zentrifugiert, um eventuelle Immunpräzipitate zu sedimentieren (Eppendorf Tischzentrifuge, 10 min). Je 200 µl der Überstände wurden auf Squalencyclase-Aktivität untersucht.

2.6.4.2. Test auf anti-M_r=75000-Protein-Antikörper

Um zu testen, ob die Mäuse bzw. das Kaninchen Antikörper gegen das gespritzte Protein (M_r=75000) gebildet hatten,wurde die solubilisierte, durch DEAE-Chromatographie angereicherte Enzymfraktion nach elektrophoretischer Auftrennung im SDS-Polyacrylamid-Gel auf Nitrocellulosefilter (Satorius SM 11306,Porengröße 0.45 µm) elektrotransferiert ("Western-Blot"; 12 V, 1 A, 90-120 min; Transfer in 25 mM Natriumphosphat, pH 6.5). Ein Teil des Nitrocellulosefilters wurde mit Amidoschwarz auf Protein angefärbt. Der restliche Filter wurde, modifiziert nach BATTEIGER et al. (1982), 1 h bei 37 °C in 150 mM NaCl, 15 mM Tris/HCl, pH 7.5, 0.5 mg/ml Tween 20 gebadet, um eine unspezifische Proteinbindung an die nicht besetzten Proteinbindungsstellen des Nitrocellulosefilters zu verhindern. Anschließend wurde der Filter in Streifen geschnitten. Diese wurden mit den verschiedenen Verdünnungen der Seren im o.g. Tris-Saline-Tween-Puffer 1 h bei 37 °C inkubiert und anschließend zweimal je 30 min bei 37 °C im gleichen Puffer gewaschen. Danach erfolgte eine 1 h-Inkubation mit verdünnten zweiten Antikörpern : Peroxidase-markierte Ziegen-anti-Kaninchen-IgG-Antikörper bzw. alkalische Phosphatase-markierte Ziegen-anti-Mäuse-IgG-Antikörper. Nach Waschen in Tris-Saline-Tween-Puffer (1 h, 37 °C) wurden die Filter mit dem für das entsprechende Enzym geeigneten Substrat entwickelt : 4-Chloro-1-naphthol / H_2O_2 für die Peroxidase (HAWKES et al., 1982) bzw. 5-Brom-4-chlorindoxylphosphat / Nitroblautetrazolium (BLAKE et al., 1984) für die alkalische Phosphatase.

2.7. Proteinbestimmung

Die Proteinbestimmung erfolgte nach einer Modifikation (J. K. WRIGHT, pers. Mitteilung) der Methode nach PETERSON (1977):

2 bis 60 µg Protein wurden mit dest. Wasser auf 500 µl aufgefüllt und nach Zugabe von 500 µl Lösung A (0.8 M NaOH : 10% SDS : Kupfertartrat/Carbonat-Lösung : H_2O dest. = 1 : 1 : 1 : 1 ; wobei die Kupfertartrat/Carbonat-Lösung aus 10 ml 2% w/v $CuSO_4$ x 5 H_2O, 10 ml 4.8 % w/v Kaliumnatriumtartrat, 80 ml H_2O dest. und 100 ml 20% w/v Na_2CO_3 hergestellt wurde) 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zugabe von 250 µl Lösung B (Folin-Ciocalteu-Phenol-Reagenz, 1 + 5 mit dest. Wasser verdünnt) und weiteren 30 min bei Raumtemperatur wurde die Extinktion der Proben bei 578 nm gemessen. Die Eichkurve wurde mit Rinderserumalbumin (BSA) als Standard erstellt.

III. ERGEBNISSE

3. ENTWICKLUNG EINES ENZYMTESTS

Der Enzymtest für die Squalencyclase aus *Bacillus acidocaldarius* wurde in Anlehnung an vergleichbare Testsysteme für Squalen- (ZANDER et al., 1970; ROHMER et al., 1980a) bzw. Epoxysqualencyclasen (DEAN, 1969; BEASTALL et al., 1971; SAAT & BLOCH, 1976) aus Pro- und Eukaryonten entwickelt. Diese setzen sich aus drei Abschnitten zusammen:

a) Inkubation des wasserunlöslichen, radioaktiv markierten Substrats (Squalen bzw. Epoxysqualen) mit der enzymhaltigen Probe in gepufferter Lösung
b) Ausschütteln hydrophober Stoffe, darunter Enzymsubstrat und Reaktionsprodukte, mittels organischer Lösungsmittel
c) Trennung und quantitative Bestimmung von Substrat und Produkten

Dieser Aufbau ist auch bei dem hier erarbeiteten Enzymtest wiederzufinden.

3.1. Inkubationsbedingungen des Squalencyclase-Tests

3.1.1. Wahl der Enzymquelle

Mit dem in vitro Squalencyclase-Test konnte bei intakten *B.a.*-Zellen kein Squalenumsatz gemessen werden. Lysozym-Protoplasten und ultraschallbehandelte Zellen zeigten gleichgroße spezifische Enzymaktivitäten. Auf Grund ihrer großen Zeitersparnis wurde die Ultraschallbehandlung dem Lysozymverdau der Zellen vorgezogen.

Die verwendeten Zellen stammten generell aus einer logarithmisch gewachsenen Zellkultur, die in Sporulations-

medium bei pH 3.5 und 50 °C gezogen wurden. Es konnte keine Abhängigkeit der spezifischen Enzymaktivität von den Wachstumsbedingungen - getestet wurden gereinigte Membranen von Zellen, die bei pH 3/60 °C, pH 3/45 °C, pH 5.5/60 °C und pH 5.5 /45 °C gezogen worden waren - gefunden werden.

3.1.2. Wahl der Squalenkonzentration

In Anlehnung an Epoxysqualencyclase-Assays von BEASTALL et al. (1971) bzw. SAAT & BLOCH (1976), die 2,3-Oxidosqualen 43 bzw. 4.3 µM in den Test einsetzten, wurde das Enzymmaterial aus *B.a.* beim Standard-Squalencyclase-Test mit 50 nMolen [^{3}H]-Squalen in 1 ml Testvolumen inkubiert. Diese Konzentration lag ein Vielfaches über dem für die Squalen-Hopen-Cyclase aus *B.a.* ermittelten K_m für Squalen (vergl. 6.4.).

3.1.3. Wahl des Emulgierungsmittels für das Squalen

Ohne Zusatz lösungsvermittelnder Emulgatoren für das wasserunlösliche Squalen wurde im Ultraschallhomogenat von *B.a.*-Zellen nur geringe Squalencyclase-Aktivität gemessen (Tab. 1). Deshalb war es notwendig, das Squalen in der 10fach konzentrierten, 500 µM Stammlösung (Squalenendkonzentration im Test 50 µM) zu emulgieren. Zu höchsten Cyclisierungsraten führte die Emulgierung mit 1 mg/ml Triton X-100 in der Squalen-Stammlösung (Tab. 1). Optimale Konzentrationen anderer Detergenzien (zur Detergenzabhängigkeit der Reaktion vergl. 6.5.2.) sowie Emulgierung durch BSA resultierten in geringeren Squalenumsätzen; mit Lipiden (Dipalmitoyl-Phosphatidylcholin: ca. 1 mg/ml; bzw. *B.a.*-Lipide: ca. 5 mg/ml) konnte Squalen nur unvollständig emulgiert werden.

Tab. 1 : Einfluß der Squalenemulgierung auf die Squalencyclase-Aktivität

Die Tabelle gibt den Einfluß des Emulgierungsmittels für das Squalen auf die Aktivität des untersuchten Enzyms wieder. Die spezifische Squalencyclase-Aktivität wurde in 2h-Standardinkubationen von *B.a.*-Ultraschallhomogenat (ca. 1.6 mg Protein pro Testansatz) in 0.1 M Kaliumphosphat, pH 7.4, ermittelt; die Endkonzentrationen der Emulgatoren im Test entsprechen 1/10 der angegebenen Werte.

Emulgator	Emulgatorkonzentration zur Emulgierung von Squalen in der Squalenstammlösung (mg/ml)	spezifische Squalencyclase-Aktivität (nMole Umsatz/mg·h)
-	-	0.2
Tween 80	50	0.7
Deoxycholat	10	4.4
Triton X-100	1	5.5
BSA	1	1.7

3.1.4. Wahl des Puffersystems

Um eine ausreichende Pufferkapazität zu gewährleisten, wurden die Inkubationen in 100 mM Puffer - zunächst Kaliumphosphat, pH 7.4, nach Optimierung dann Natriumcitrat, pH 6 (vergl. 5.) - durchgeführt.

Schütteln der Reaktionsgefäße während der Inkubation führte zu keiner Steigerung des Squalenumsatzes.

3.2. Extraktion von Substrat und Reaktionsprodukten

Der Enzymtest wurde durch Zugabe von organischen Lösungsmitteln gestoppt. Dadurch wurden Enzymsubstrat und Reaktionsprodukte in die organische Phase überführt und einer anschließenden Trennung zugänglich.

Folgende Systeme zur Extraktion hydrophober Substanzen wurden auf ihre Fähigkeit, die Radioaktivität vor und nach enzymatischem Umsatz in die organische Phase zu überführen, getestet:

n-Hexan	: H_2O			= 2:1
n-Hexan	: 50 mM KCl			= 1:1
Diethylether	: Ethanol			= 3:1*
Chloroform	: Methanol	: H_2O		= 2:2:1
n-Hexan	: Methanol	: H_2O		= 2:2:1
n-Hexan	: Isopropanol	: H_2O		= 3:2:2.5
n-Hexan	: Aceton	: H_2O		= 2:2:1
n-Hexan	: Aceton	: Methanol	: H_2O	= 4:1:1:2

(* : Extraktion des 10%-Trichloressigsäure-Präzipitats)

Unter den getesteten Methoden konnte nur mit der Hexan-Isopropanol-Extraktion nach HARA & RADIN (1978) eine sofortige und vollständige Verdrängung von Reaktionssubstrat und -produkten aus der wässrigen in die organische Phase erzielt werden; nur bei sehr hohen Proteinkonzentrationen im Test war zur Phasentrennung Zentrifugieren notwendig. Bei sämtlichen anderen Verfahren war der Grad der Extrahierbarkeit stark von der Extraktionsdauer abhängig und eine vollständige Phasentrennung konnte erst durch Zentrifugation erreicht werden. In keinem der untersuchten Systeme führte Zusatz von Carriersqualen zu einer Steigerung des Extraktionsgrades.

3.3. Trennung und quantitative Bestimmung von Substrat und Produkten

Unter den *Bacillus acidocaldarius*-Lipiden befindet sich eine Reihe von pentacyclischen Triterpenen (Hopen, Tetrahydroxybakteriohopan, Hopan-Glykolipid), die vermutlich aus Squalen nach dessen Cyclisierung entstehen (DE ROSA et al., 1983). Diplopterol kommt nur in einem geringen Prozentsatz vor (1% der Gesamtlipide; ROHMER et al., 1984) und konnte neben Hopen als ein Produkt der untersuchten Squalencyclase-Reaktion identifiziert wer-

den (vergl. 4.). Eine alkalische Methanolyse (5% KOH in 50% Methanol) vor der Extraktion mit organischen Lösungsmitteln, wie sie bei vielen Oxidosqualencyclase-Tests durchgeführt wird (DEAN, 1969; BEASTALL et al., 1971; SAAT & BLOCH, 1976), um z.B. Cholesterolester zu verseifen und damit extrahierbar zu machen, führte hier zu keiner Änderung in Art und Anzahl der Reaktionsprodukte. Somit beschränkte sich die Analyse auf die Trennung und quantitative Bestimmung von Squalen, Hopen und Diplopterol.

3.3.1. Trennung von Squalen, Hopen und Diplopterol

3.3.1.1. Dünnschichtchromatographische Trennung

Zur Trennung von Substrat und Produkten wurde hier, wie in vielen vergleichbaren Enzymsystemen (DEAN, 1969; ZANDER et al., 1970; BEASTALL et al., 1971; SAAT & BLOCH, 1976; ROHMER et al., 1980a), ein dünnschichtchromatographisches Verfahren entwickelt (Tab.2). Eine zweistufige

Tab. 2 : Dünnschichtchromatographische Trennung von Squalen, Hopen und Diplopterol

DC-Material	Laufmittel	R_f-Werte		
		Squalen	Hopen	Diplopterol
Kieselgel 60	n-Hexan	0.08	0.44	0
Kieselgel 60	Cyclohexan	0.17	0.52	0
Kieselgel 60	Chloroform	0.75	0.72	0.4
Kieselgel 60	1/3-Entwicklung mit Chloroform, dann 1/1-Entwicklung mit n-Hexan	0.4	0.6	0.1
Kieselgel 60, imprägniert mit 2.5% $AgNO_3$	Chloroform	0.08	0.55	0.38

Entwicklung in verschiedenen Laufmitteln (1. Entwicklung in Chloroform, 1/3 Laufstrecke; 2. Entwicklung in n-Hexan, 1/1 Laufstrecke) ermöglichte eine klare Trennung der drei Stoffe auf Kieselgel 60-DC-Platten. Eine ähnlich gute Trennung konnte nach Silbernitrat-Imprägnierung der Kieselgel-Platten und Entwickeln in Chloroform erzielt werden (Tab.2).

3.3.1.2. Säulenchromatographische Trennung

Da die dünnschichtchromatographische Trennung mit Einengen und quantitativem Auftrag der verbleibenden organischen Phase auf die DC-Platten sowie die anschließende Entwicklung der Chromatographien einen relativ großen Zeitaufwand erfordern und sich eine Quantifizierung der Stoffe noch anschließen muß, wurde versucht, ein säulenchromatographisches Verfahren zu entwickeln, welches ermöglicht, die organische Phase ohne vorheriges Einengen aufzutragen, und welches die eluierten radioaktiven Fraktionen einer direkten Flüssigszintillationszählung zugänglich macht (Tab. 3). Mit keinem der getesteten Säulenmaterialien konnten die drei Stoffe ausreichend voneinander getrennt werden. Der Einsatz der Säulenchromatographie für den Squalencyclase-Test scheiterte besonders daran, daß Squalen und Hopen nicht quantitativ voneinander separiert wurden: Squalen konnte zwar in einigen Chromatographiesystemen etwas zurückgehalten werden, während das Hopen keine Adsorption zeigte, doch wurden Teile des Squalens schon während des Waschens eluiert. Gleiche Probleme ergaben sich bei dem Versuch, die unterschiedliche Zahl der Doppelbindungen von Squalen und Hopen für deren Trennung auszunutzen (Chromatographie an Silbersäulen; Tab.3).

3.3.1.3. (Radio-) Gaschromatographische Trennung

Ein Gemisch von Squalen, Hopen und Diplopterol konnte gaschromatographisch aufgetrennt werden: Bei einem Temperaturgradienten von 180-300 °C (4 °C/min)auf einer OV 1-Säule ergaben sich für die drei Substanzen

Tab. 3 : Säulenchromatographie zur Trennung von Squalen, Hopen und Diplopterol

Das zu trennende Stoffgemisch wurde in 2 ml n-Hexan auf trockene bzw. mit dem Lösungsmittel equilibrierte (Es ergaben sich keine unterschiedlichen Versuchsergebnisse für beide getesteten Verfahren.) 2 ml-Säulen aufgetragen. Die Säule wurde mit 2fachem Säulenvolumen n-Hexan gewaschen und mit u.g. Lösungsmittel eluiert; 1 ml-Fraktionen wurden gesammelt und dünnschichtchromatographisch auf ihre Zusammensetzung untersucht.

Säulenmaterial	Adsoroption aus n-Hexan			Elutionmittel	Trennung von Squalen und Hopen
	Squalen	Hopen	Diplopterol		
Kieselgel	(+)	+	-	Methylenchlorid	-
Florisil	(+)	+	-	Methylenchlorid	-
säurebehandeltes Florisil [a]	(+)	+	-	Methylenchlorid oder Chloroform	-
$AgNO_3$-imprägniertes Kieselgel (1,2.5 bzw. 25% w/w)	(+)	-	-	Methylenchlorid	-
Ag^+-beladenes Dowex WX8 [b]	-	-	-	Cyclohexan, 10% KOH in Methanol oder 2.5% $AgNO_3$	-

[a] Für die Säurebehandlung (KATES, 1982) wurde das Florisil wiederholt mehrere Stunden unter Rückfluß mit konzentrierter Salzsäure erhitzt und mit Wasser chloridfrei gewaschen. Anschließend wurde es mit Methanol, Chloroform und schließlich mit Diethylether gewaschen, dann getrocknet.

[b] Für die Silberionen-Beladung wurde das Dowex WX8-Harz mit wässriger Silbernitratlösung equilibriert, anschließend Ag^+-frei gewaschen und mit dem Auftragslösungsmittel equilibriert (KROPPENSTEDT, 1982).

Retentionszeiten von 13 min (Squalen), 18.5 min (Hopen) und 22 min (Diplopterol). Die Gaschromatographie erwies sich jedoch als nicht für den Enzymtest geeignet, da der

Umsatz vor einem Hintergrund von Zelltriterpenen gemessen wurde und es beim Aufnehmen der getrockneten organischen Phase offensichtlich nicht möglich war, reproduzierbar alle Komponenten im gleichen Ausmaß zu lösen. Zudem erforderte eine gaschromatographische Analyse größerer Meßreihen einen erheblichen Zeitaufwand.

Diese Einschränkung gilt auch für die Anwendbarkeit der Radiogaschromatographie, bei welcher der Gasstrom nach der Chromatographiesäule zwischen Flammenionisations- und Radiodetektor aufgeteilt wird. Für die radiogaschromatographische Analyse wurde höher markiertes Squalen, als im Standardtest üblich, eingesetzt, da nur ein Aliquot der eingeengten organischen Phase eingespritzt werden konnte. Eine Trennung der drei Substanzen konnte auch hier erzielt werden, doch war der Radiodetektor zu unempfindlich. Besonders für die geringen Mengen Diplopterol lagen die Meßwerte nur schwach über dem Hintergrundsrauschen. Folglich würde eine Anwendung der Radiogaschromatographie durch die notwendige weitere Erhöhung der spezifischen Radioaktivität des Squalens die Kosten für den Enzymtest unnötig steigern.

3.3.2. Quantitative Bestimmung von Squalen, Hopen und Diplopterol

Zur quantitativen Bestimmung der radioaktiven, dünnschichtchromatographisch getrennten Stoffe wurde die Verteilung der Radioaktivität auf den Dünnschichtplatten entweder durch Scannen mit einem Radio-Dünnschichtscanner oder durch Auskratzen der vorher durch Besprühen mit Berberinchlorid angefärbten Flecken aus dem Dünnschichtchromatogramm und anschließendes Zählen im Flüssigszintillationszähler bestimmt.

Nach enzymatischem Umsatz von [^{3}H]-Squalen durch Enzymmaterial aus *Bacillus acidocaldarius* waren im Scan maximal drei Reaktionsgipfel deutlich zu erkennen (Abb. 9), deren Laufverhalten auf der Dünnschichtplatte mit den

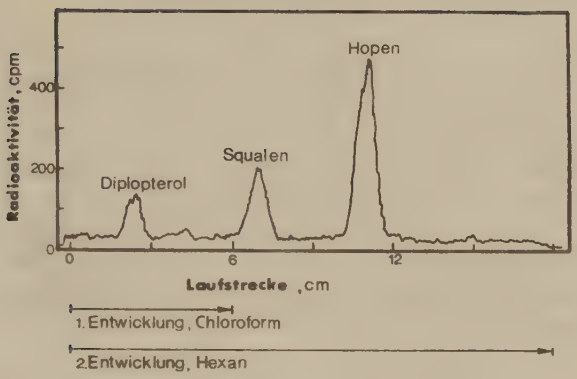


Abb. 9 : Radio-Dünnschichtscan des organisch extrahierbaren Materials aus *Bacillus acidocaldarius* nach enzymatischem Umsatz von [^{3}H]-Squalen

Die Abbildung zeigt einen typischen Radio-Dünnschichtscan nach enzymatischem Umsatz von [^{3}H]-Squalen durch *B. a.*-Zellhomogenat. Im vorliegenden Fall wurde im Standard-Squalencyclase-Test Ultraschallhomogenat der Zellen (ca. 1.6 mg Protein) 22 h in 0.1 M Kaliumphosphat, pH 7.4, inkubiert; Squalen wurde zu 70% umgesetzt, wobei die Produkte zu 4/5 aus Hopen und 1/5 aus Diplopterol bestanden.

Vergleichssubstanzen für Squalen, Hopen und Diplopterol übereinstimmte. Zur quantitativen Bestimmung der Einzelstoffe wurden die Flächen unter den Kurven integriert bzw. die Gipfel ausgeschnitten und gewogen. Besonders bei kleinen Squalenumsätzen erwies sich diese Methode als zu ungenau; zudem nahm das Scannen bei sparsam eingesetzter Radioaktivität sehr viel Zeit in Anspruch (3 h/ Spur).

Schneller und genauer waren die gebildeten Mengen an Hopen und Diplopterol durch Auskratzen der angefärbten Flecken aus dem Dünnschichtchromatogramm und Zählen der im so erhaltenen Kieselgelpulver enthaltenen Radioaktivität im Flüssigszintillationszähler zu bestimmen.

4. IDENTIFIZIERUNG DER CYCLISIERUNGSPRODUKTE

Enzymatische Cyclisierung von ^{3}H-markiertem Squalen durch *Bacillus acidocaldarius*-Enzymmaterial führte zur Bildung von zwei radioaktiven Produkten, die, unabhängig vom Grad der Anreicherung des Enzyms und unabhängig von den Testbedingungen, in einem etwa konstanten Mengenverhältnis von 4 bis 5 Teilen Hopen und 1 Teil Diplopterol entstanden (vergl. auch 6.4.). Die Identität der Produkte mit Diplopterol und Hopen wurde durch folgende Analysen bestätigt:

4.1. Dünnschichtchromatographische Identifizierung

Es konnte gezeigt werden, daß die nach enzymatischem Umsatz von [^{3}H]-Squalen entstandenen radioaktiven Produkte in zwei verschiedenen Chromatographiesystemen (1. Kieselgel 60-Platten mit erster 1/3-Entwicklung in Chloroform und zweiter Entwicklung in n-Hexan; 2. 2.5% Silbernitrat-imprägnierte Kieselgel 60-Platten mit Entwicklung in Chloroform; vergl. Tab. 2, Seite 41) identisches Laufverhalten mit den Vergleichssubstanzen für Diplopterol und Hopen aufwiesen.

4.2. Radiogaschromatographische Identifizierung

Bei der radiogaschromatographischen Analyse wird der Gasstrom nach Austritt aus der Chromatographiesäule, auf der die untersuchten Substanzen getrennt wurden, zwischen Flammenionisationsdetektor (FID) und Radiodetektor (RD) gespalten. Auf Grund des längeren Weges vom Ende der Chromatographiesäule bis zum Radiodetektor erreicht eine zu untersuchende Substanz diesen mit einer zeitlichen Verzögerung gegenüber dem FID-Signal. Durch Einspritzen von radioaktivem, mit Trägersubstanz versetztem Squalen

wurde diese Zeitverzögerung mit 1 min bestimmt (Squalen: t_r(FID)= 1.6 min; t_r(RD)= 2.6 min). Nach enzymatischem Umsatz von [^{3}H]-Squalen (50 nMole, 7.40 kBq) konnte Hopen als Cyclisierungsprodukt deutlich im Radiodetektor identifiziert werden: Die Retentionszeit (Hopen: t_r(RD)= 5.2 min) stimmte gut mit der von Hopen-Vergleichssubstanz im Flammenionisationsdetektor überein (Hopen: t_r(FID)= 4.3 min). Neben nicht umgesetztem Squalen konnte ein weiterer Radioaktivitätsgipfel gefunden werden. Dieser war nur schwach zu erkennen und könnte auf Grund seiner Retentionszeit (t_r(RD)= 6.8 min) mit Diplopterol identisch sein (Vergleichssubstanz für Diplopterol: t_r(FID)= 5.9 min).

4.3. Gaschromatographische Identifizierung

Zur Herstellung größerer Mengen nicht radioaktiver Squalencyclase-Reaktionsprodukte wurden ca. 20 mg Squalen durch tritonfreies Membransolubilisat von *Bacillus acidocaldarius* enzymatisch zu ca. 15% (wie unter 2.3. beschrieben) in Diplopterol (ca. 0.5 mg) und Hopen (ca. 2.5 mg) umgesetzt. Die gereinigten Reaktionsprodukte zeigten mit Retentionszeiten von 3.5 bzw. 4.8 min auf einer OV 1-Säule (isothermer Lauf bei 280 °C) mit Hopen- und Diplopterol-Vergleichssubstanzen identische Werte; das Hopen war zu ca. 97% , das Diplopterol zu etwa 81% gaschromatographisch rein.

4.4. Massenspektrometrische Identifizierung

Abbildung 10 zeigt die Massenspektrogramme der Cyclisierungsprodukte nach gaschromatographischer Abtrennung von Verunreinigungen (Tritonreste, Siliconfette), die beim Hopen nur etwa 3% ausmachten, während sie beim Diplopterol immerhin knapp 20% erreichten. Die Massenspektrogramme der beiden Reaktionsprodukte zeigten für Hopen und Diplopterol charakteristische Molekülpeaks (M^+/e (Ho-

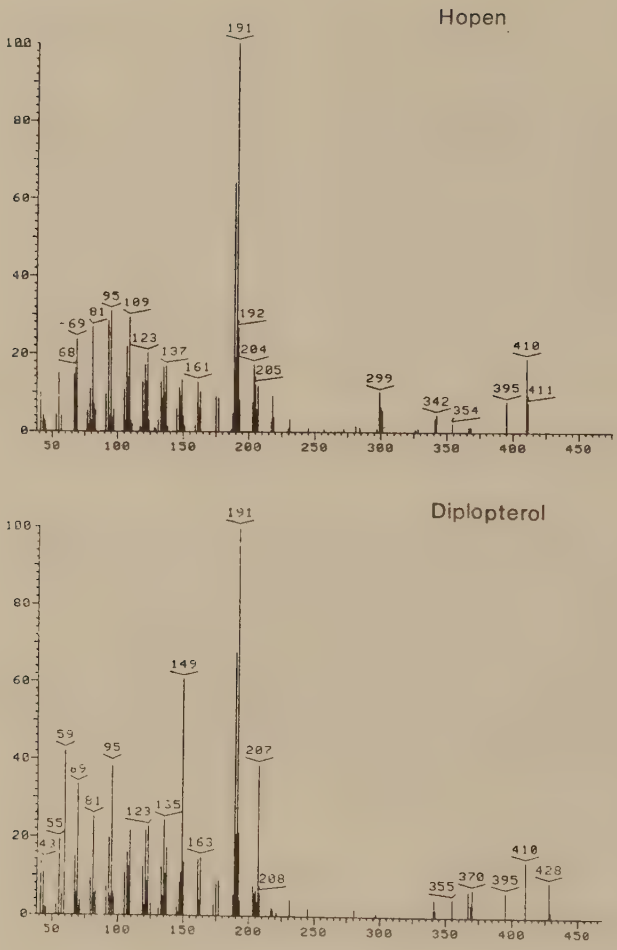


Abb. 10 : Massenspektren der Squalencyclase-Reaktionsprodukte in *Bacillus acidocaldarius*

pen)= 410, M^+/e (Diplopterol)= 428) und charakteristische Fragmente (Hopen, m/e: 395, 191, 189, 109, 95; für Diplopterol zusätzlich m/e: 370, 367, 207, 149; SCHMIDT & HUNECK, 1979; BARROW et al., 1983). Durch die GC/MS-Analyse konnte endgültig bewiesen werden, daß es sich bei den Produkten der Squalencyclase aus *Bacillus acidocaldarius* um Hopen und Diplopterol handelt.

5. OPTIMIERUNG DES SQUALENCYCLASE-TESTS

5.1. Optimierung der Inkubationstemperatur

Da in der vorliegenden Arbeit die Squalencyclase aus *Bacillus acidocaldarius*, einem thermophilen Organismus, untersucht wurde, lag es nahe, die Inkubationstemperatur mit der Wachstumstemperatur zu vergleichen. Nach anfänglichen 50 °C-Inkubationen wurde für die optimale Temperatur des Enzymtests ein Wert von 60 °C ermittelt (Abb. 11).

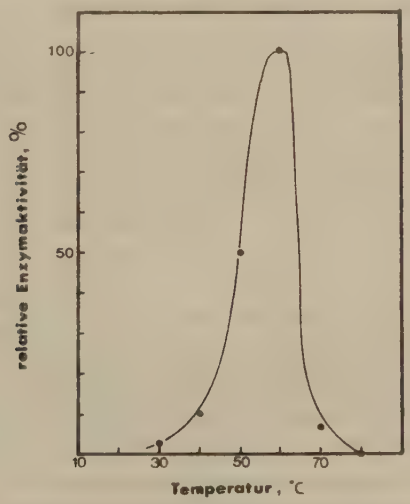


Abb. 11 : Temperaturabhängigkeit der Squalencyclase

Relative Squalencyclisierungsraten von *B.a.*-Ultraschallhomogenat, 45 min-Standardinkubation in 0.1 M Kaliumphosphat, pH 7.4, bei 0.5 mg/ml Tween 80 und 4.5 mg Protein im Test; Maximalumsatz: 0.85 nMole/mg·h.

5.2. Optimierung des Test-pH

Bei allen Standardinkubationen wurde in 0.1 M Puffer inkubiert, um das zugegebene Enzymmaterial - häufig Ultraschallhomogenat ganzer Zellen - ausreichend zu puffern. In Anlehnung an Epoxysqualencyclase-Testsysteme (DEAN,1969; SAAT & BLOCH, 1976) wurden erste Squalencyclisierungsversuche bei pH 7.4 in 0.1 M Kaliumphosphat-Puffer durchgeführt. In pH-Abhängigkeitsmessungen konnte gezeigt werden, daß in allen getesteten Puffersystemen optimale Cyclisierungsraten im leicht sauren pH-Bereich (pH 5.5-6.5) zu erzielen waren (Abb. 12). Bei den für diesen Bereich geeigneten Puffern fiel für den Squalencyclase-Test die Wahl auf Natriumcitrat (Kaliumcitrat war genauso geeignet) mit einem pK_{S_3}-Wert von 6.4 (COOPER, 1981), da in N-Morpholinoethansulfonsäure-Puffer (pK_S = 6.15; COOPER, 1981) nur 31% des - unter sonst identischen Testbedingungen - in Natriumcitrat gemessenen Umsatzes erzielt werden konnte.

6. CHARAKTERISIERUNG DER SQUALEN-HOPEN-CYCLASE

Nach Entwicklung und Optimierung eines Standardtests für die Squalen-Hopen-Cyclase aus *Bacillus acidocaldarius* wurde das Enzym auf seine Lokalisation, Stabilität, Kinetik und seine Reaktionen auf Zusatz verschiedener Substanzen untersucht.

6.1. Lokalisierung der Squalencyclase

Zur Lokalisierung der Squalencyclase wurde das Ultraschallhomogenat von *B.a.*-Zellen nach Entfernen von restlichen intakten Zellen und großen Zelltrümmern in Cytosol und Cytoplasmamembran getrennt (Ultrazentrifugation). Bei Aufarbeitung in 10 bzw. 100 mM Kaliumphosphat, pH 7.4, bzw. Natriumcitrat, pH 6, wurde sämtliche Squalencyclase-

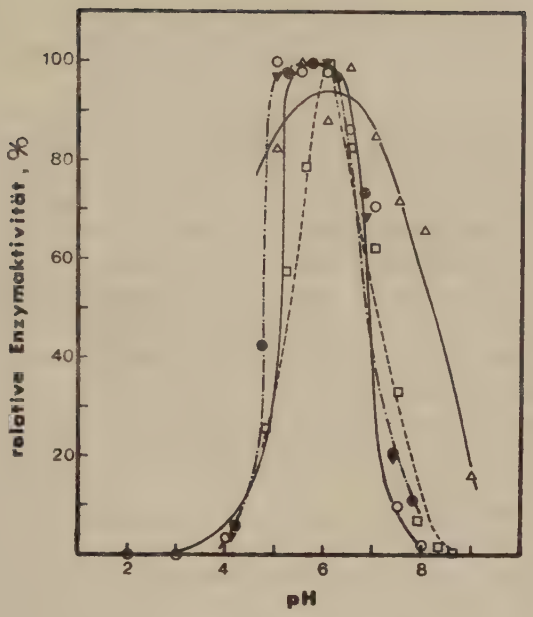


Abb. 12 : pH-Abhängigkeit der Squalencyclase-Aktivität

a) △———△ Kaliumphosphat / Tris

b) ○———○ Natriumcitrat / Natriumphosphat

c) □-------□ Kaliumphosphat

d) ▼-·-·-·-▼ Natriumcitrat

e) ●-·-·-·-● Kaliumcitrat

Realative Squalencyclisierungsraten in *B.a.*-Ultraschallhomogenat; 17 h- (a,b) bzw. 21.5 h-Standardinkubation (c-e) in 0.1 M Puffer bei 0.1 mg/ml Triton X-100 und 0.14 mg (a,b), 0.2 mg (c) bzw. 0.27 mg (d,e) Protein im Test; maximal ca. 0.9 (a,b), 4.8 (c), bzw. 3.9 (d,e) nMole Squalenumsatz / mg·h.

Aktivität im 105000 g-Niederschlag wiedergefunden. Als Membran-Markerenzym war auch die Succinat-Dehydrogenase (Enzymtest nach REAVELEY & ROGERS, 1969, bei 60 °C) nur in

dieser Fraktion zu lokalisieren. Durch Entfernen der cytosolischen Proteine wurden beide Enzyme ca. 3- bis 4fach angereichert.

6.2. Solubilisierung der Squalencyclase

Nach Anreicherung der Squalencyclase im Ultrazentrifugationsniederschlag wurde versucht, das Enzym von der Cytoplasmamembran zu lösen, um es einer weiteren Reinigung zugänglich zu machen.

In Vorversuchen wurde die Ultraschallbehandlung der Zellen und die Aufarbeitung des Homogenats unter wechselnden Bedingungen durchgeführt. Dabei wurde das zellfreie Ultraschallhomogenat vor der Ultrazentrifugation mit und ohne Reagenz-(z.B. Detergenz-) Zusatz 30 min bei 0 oder 60 °C inkubiert. Tabelle 4 zeigt, daß die Squalencyclase in Puffern verschiedener pHs bei 0°C-Inkubationen vollständig an der Membran haftete und auch bei entsprechender 60°C-Behandlung vorwiegend membranständig blieb. Zunehmende Solubilisierung bei alkalischem pH wurde von einer zunehmenden Inaktivierung des Enzyms begleitet. Nach Einsatz chaotroper Reagenzien (0.5-2 M Natriumthiocyanat, 2-6 M Harnstoff, 0.25 M Sulfosalicylsäure, jeweils in 0.1 M Kaliumphosphat, pH 7.4) und Dialyse der so erhaltenen Proben konnte weder im Ultrazentrifugationsüberstand noch im -niederschlag Squalencyclase-Aktivität gemessen werden. Erhöhung der Ionenstärke (KCl) und EDTA-Zusatz hatten keine Enzymsolubilisierung zur Folge, doch konnten bei Ionenstärke-Erniedrigung leichte Ablösungstendenzen gefunden werden, die mit einer zunehmenden Gesamtprotein-Solubilisierung gekoppelt waren. Stärkere und reproduzierbarere Solubilisierungen der Squalencyclase konnten durch Detergenzzugabe erzielt werden.

Die Tendenzen der Vorversuche konnten mit Solubilisierungsexperimenten an gereinigten Cytoplasmamembranen bestätigt werden. Membranproteine und Squalencyclase-Aktivität wurden - je nach Solubilisierungsbedingung - mit

Tab. 4 : Solubilisierbarkeit der membrangebundenen Squalencyclase durch Aufarbeiten des *Bacillus acidocaldarius*-Homogenats unter wechselnden Bedingungen

B.a.-Zellen wurden in u.g. Puffer ultraschallbehandelt, die Zelltrümmer wurden entfernt. Der Zentrifugationsüberstand wurde - z.T. nach Zusatz u.g. Reagenzien - 30 min bei angegebener Temperatur inkubiert (Proteinkonzentration ca. 2 mg/ml), bevor er durch Ultrazentrifugation in Cytosol und Membranfraktion getrennt wurde. Die Niederschläge wurden in dem entsprechenden Solubilisierungspuffer (ohne Reagenzienzusatz) resuspendiert. Von beiden Fraktionen wurden jeweils 100 µl auf Squalencyclase-Aktivität untersucht (2h-Standardinkubation in 0.1 M Kaliumphosphat, pH 7.4).

Puffer*	Zusätze, Konzentration während der Solubilisierung	Inkubationstemperatur	% im Ultrazentrifugationsüberstand	
			Protein	Squalencyclase
100mM NaC, pH 6	-	0 °C	44	0
10mM NaC, pH 6	-	0 °C	48	0
100mM KP , pH 7.4	-	0 °C	45	0
100mM KP , pH 7.4	-	60 °C	50	4
10mM KP , pH 7.4	-	0 °C	48	0
10mM KP , pH 7.4	-	60 °C	52	10
10mM KP , pH 9	-	60 °C	51	22
10mM KP , pH 11.5	-	60 °C	68	25**
100mM KP , pH 7.4	,0.2-1 M KCl	60 °C	30	0
10mM NaC, pH 6	,0.1 M EDTA	60 °C	42	1
100mM KP , pH 7.4	,0.1 mg/ml Triton X-100	60 °C	55	2
100mM KP , pH 7.4	,1 mg/ml Triton X-100	60 °C	58	96
100mM NaC, pH 6	,1 mg/ml Triton X-100	60 °C	54	98
100mM KP , pH 7.4	,2 mg/ml Na-Deoxycholat	60 °C	66	92

* : KP = Kaliumphosphat, NaC = Natriumcitrat

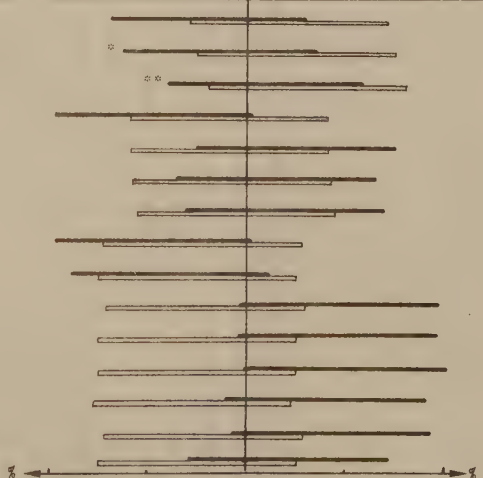
** : 50% Inaktivierung der Squalencyclase

unterschiedlicher Präferenz in den Ultrazentrifugationsüberstand überführt (Tab.5). Durch niedrige Ionenstärke und alkalischen pH wurde bis zur Häfte der Enzymaktivität von der

Tab. 5 : Solubilisierbarkeit der Squalencyclase aus gereinigten *B.a.*-Membranen

Gereinigte *B.a.*-Membranen wurden in u.g. Puffer bei angegebener Temperatur 30 min inkubiert (ca.2 mg/ml Membranprotein) bevor sie durch Ultrazentrifugation in Solubilisat (Überstand) und Restmembranen (Niederschlag) getrennt wurden. Die Sedimente wurden im entsprechenden Solubilisierungspuffer (ohne Zusätze) resuspendiert. 100µl beider Proben wurden auf Squalencyclase-Aktivität untersucht (1h-Standardinkubation in 0.1M Natriumcitrat, pH 6).

Puffer*	Solubilisierungszusätze (mg/ml) Na-Deoxycholat	Triton X-100	Solubilisierungs-temperatur	Verteilung von Squalencyclase-Aktivität (➡) und Proteingehalt(⟹) auf UZ-Niederschlag | UZ-Überstand
H_2O bidest	-	-	60 °C	
10mM Tris, pH 8	-	-	60 °C	
10mM Carbonat,pH 10	-	-	60 °C	
100mM KP, pH 7.4	-	-	60 °C	
100mM KP, pH 7.4	1	-	60 °C	
100mM KP, pH 7.4	2	-	60 °C	
100mM KP, pH 7.4	4	-	60 °C	
100mM NaC, pH 6	-	0.1	60 °C	
100mM NaC, pH 6	-	0.2	60 °C	
100mM NaC, pH 6	-	0.5	60 °C	
100mM NaC, pH 6	-	0.75	60 °C	
100mM NaC, pH 6	-	1	60 °C	
100mM NaC, pH 6	-	2	60 °C	
100mM NaC, pH 6	-	4	60 °C	
100mM NaC, pH 6	-	4	0 °C	



* : KP = Kaliumphosphat, NaC = Natriumcitrat ; ** : 50% bzw. *** : 80% Squalencyclase-Inaktivierung

Membran abgelöst, doch war diese Squalencyclase-Solubilisierung von einer noch stärkeren Membranprotein-Ablösung begleitet. Mit steigendem pH wurde auch hier die Squalencyclase zunehmend inaktiviert. Gute Solubilisierbarkeit des Enzyms durch Natriumdeoxycholat zog eine erhebliche Proteinsolubilisierung (ca. 50%) mit sich. Dagegen konnte die Squalencyclase durch Triton X-100-Behandlung bevorzugt in den Ultrazentrifugationsüberstand überführt werden; Triton X-100 wurde deshalb näher auf seine Solubilisierungseigenschaften untersucht. Wie Tabelle 5 zeigt, konnte das untersuchte Enzym durch Triton X-100 fast quantitativ solubilisiert werden. Dabei hing der Grad der Solubilisierung von der eingesetzten Detergenzkonzentration ab und war bei 60 °C- generell höher als bei 0 °C-Inkubationen. Mit steigender Membranprotein-Konzentration erhöhte sich auch die für eine optimale Enzymsolubilisierung notwendige Mindest-Tritonkonzentration; konstant war jedoch der Wert für das Triton-zu-Protein-Verhältnis, ab dem diese Optimal-Solubilisierung erreicht wurde (Abb. 13). Er lag bei ca. 0.2 mg Triton X-100 je mg Membranprotein. Unter diesen Bedingungen wurden nur etwa 15 - 20 % des Gesamt-Membranproteins von der Membran abgelöst.

Zur Präparation größerer Mengen solubilisierten Enzyms wurden gereinigte Membranen mit Triton X-100 (Mengenverhältnis: 0.2 - 0.3 mg Triton X-100 je mg Membranprotein) behandelt. So angereichertes Enzym enthielt aus der Solubilisierungsprozedur unbestimmte Mengen des eingesetzten Detergenz'. Untersuchungen an der Squalencyclase im Membransolubilisat wurden deshalb nach Entfernen des Triton X-100 durch Chromatographie an Servachrom XAD 2 durchgeführt.

6.3. Stabilität der Squalencyclase

Die Squalencyclase aus *Bacillus acidocaldarius* erwies sich als überaus lagerungsstabil. Einfrieren von ganzen Zellen, Ultraschallhomogenat bzw. gereinigten Membranen

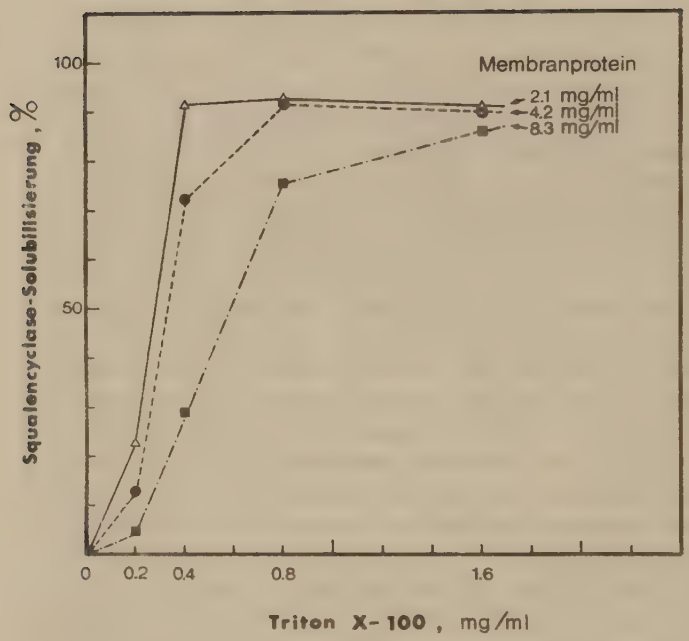


Abb. 13 : Membranprotein- und Triton X-100-Konzentrationsabhängigkeit der Squalencyclase-Solubilisierbarkeit

B.a.-Membranen wurden - nach Waschen in 10 mM Natriumcitrat, pH 6 - 30 min bei 60 °C mit 10 mM,tritonhaltigem Puffer (Detergenzkonzentration zur Solubilisierung vergl.Abb.) inkubiert, bevor sie durch Ultrazentrifugation in 105000g-Niederschlag und -Überstand getrennt wurden. 100 µl jeder Fraktion - die Niederschläge wurden in 10 mM Natriumcitrat, pH 6, aufgenommen - wurden auf Squalencyclase-Aktivität untersucht (1h-Standardinkubation in 0.1 M Natriumcitrat, pH 6).

hatte keinen Aktivitätsverlust zur Folge. Gereinigte Zellmembranen zeigten nach 26 h Lagerung bei 4 °C in 0.1 M Kaliumphosphat, pH 7.4, bzw. Natriumcitrat, pH 6, keine Abnahme der untersuchten Enzymaktivität. Auch im Membransolubilisat blieb das Enzym über den getesteten Zeitraum

drei Tagen in tritonhaltigem 10 mM Natriumcitratpuffer, pH 6, völlig stabil (Lagerung bei 4 °C). Die Stabilität der Squalencyclase in tritonfreiem Membransolubilisat wurde über den längsten Zeitraum getestet; hier konnten selbst nach 4 Wochen Lagerung in 10 mM Natriumcitrat, pH 6, bei 4 °C keine Aktivitätsverluste bemerkt werden. Ein Zusatz stabilisierender Reagenzien war daher nicht notwendig. Für die Enzymtests verwendetes Material wurde in N_2 eingefroren und bei -20 °C gelagert (ganze Zellen bzw. gereinigte Membranen) oder im Kühlschrank aufbewahrt (tritonfreies Solubilisat).

6.4. Kinetik der Squalencyclase-Reaktion

Zur Bestimmung enzymkinetischer Meßdaten wurde die Zeitabhängigkeit der Squalencyclase-Reaktion untersucht. Da für die Ermittlung des K_m-Wertes Reaktionsanfangsgeschwindigkeiten bestimmt werden müssen, wurden für das Enzym im tritonfreien Solubilisat für sieben verschiedene Squalenkonzentrationen jeweils zwei voneinander unabhängige Reaktionszeitabhängigkeiten erstellt (Abb. 14). Aus den Steigungen der Umsatzkurven im Ursprung wurden die jeweiligen Anfangsgeschwindigkeiten ermittelt. Abbildung 15 zeigt die Michaelis-Menten-Kinetik als Lineweaver-Burk-(Abb. 17 A;LINEWEAVER & BURK, 1934) und als Eadie-Hofstee-Diagramm (Abb. 17 B; EADIE, 1942; HOFSTEE, 1952). Aus den Mittelwerten aller bestimmten K_m-Werte (Abb. 17 A: 2.9 µM; Abb. 17 B: 3.2 µM; direkte Auftragung: 3.4 µM; Hanes-Diagramm: 2.8 µM; HANES, 1932) konnte für die Michaelis-Menten-Konstante ein Wert von 3 µM bestimmt werden.

Die Squalenkonzentration lag in der Standardinkubation mit 50 µM weit über dem K_m für diese Reaktion. Wie Abbildung 14 zeigt, wurde unter Standardbedingungen (Abb. 14 B) für den getesteten Reaktionszeitraum eine nahezu lineare Abhängigkeit des Squalenumsatzes von der Zeit gefunden. Die ermittelten Diplopterol-zu-Hopen-Verhältnisse zeigten bei kurzer Reaktionsdauer etwas höhere Werte (0.3 bis 0.8 Mole Diplopterol je Mol Hopen; vergl. Abb. 14)

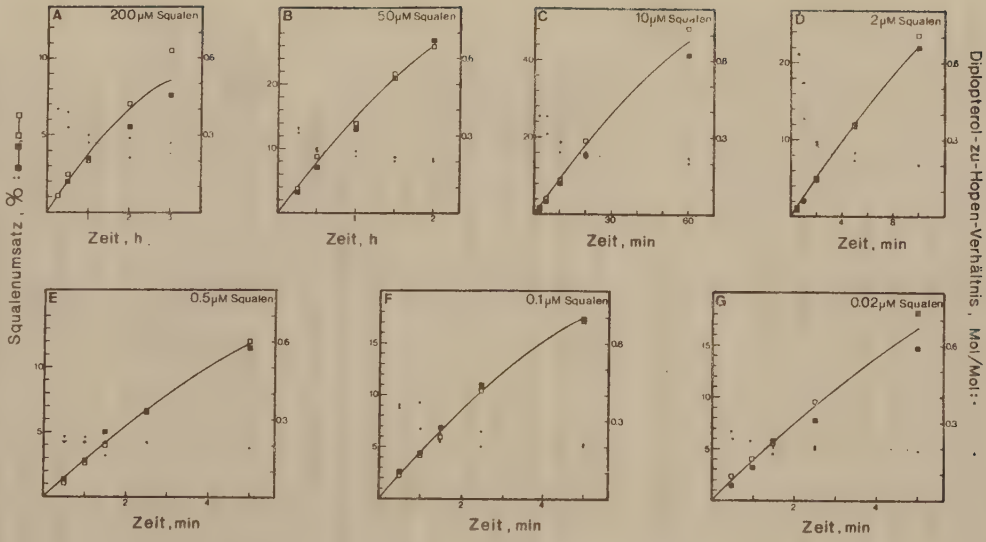


Abb. 14 : Kinetik der Squalencyclase aus *Bacillus acidocaldarius*

Die Abbildung zeigt die Zeitabhängigkeit der Squalencyclisierung bei verschiedenen Squalenkonzentrationen. Die verschiedenen Zeitwerte für den Squalenumsatz wurden bei jeder Squalenkonzentration aus jeweils zwei voneinander unabhängigen Ansätzen (■,□) ermittelt, eine jeweils gemeinsame Kurve wurde erstellt. Die Abbildung zeigt neben dem Squalenumsatz (linke Ordinate, durchgezogene Kurve) auch das molare Verhältnis der gebildeten Produkte (rechte Ordinate, gepunktete Kurve). Die Werte wurden durch 60 °C-Inkubationen von tritonfreiem Membransolubilisat (ca. 28 µg Protein pro Test) aus *Bacillus acidocaldarius* in 0.1 M Natriumcitrat, pH 6, mit 0.2 mg/ml Triton X-100 und angegebener Squalenkonzentration ermittelt. Die Reaktionen wurden nach 5-minütigen Vorinkubationen bei 60 °C durch Zugabe der jeweils 10fach konzentrierten Squalenemulsion gestartet.

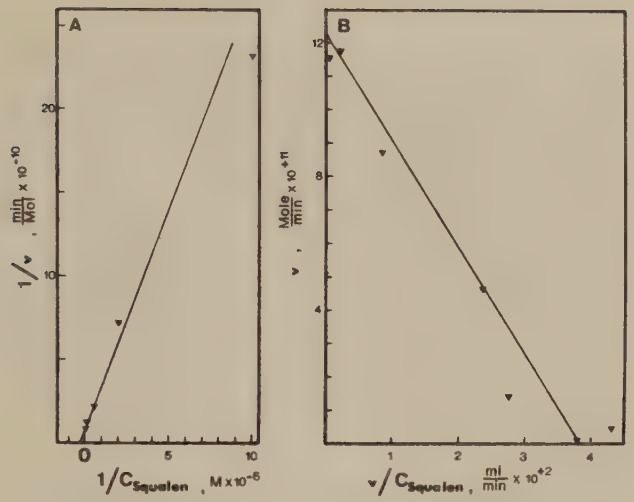


Abb. 15 : Michaelis-Menten-Kinetik der Squalencyclase aus *Bacillus acidocaldarius*

Die Abbildung zeigt die Abhängigkeit der aus Abb. 14 ermittelten Reaktions-Anfangsgeschwindigkeiten von der eingesetzten Squalenkonzentration als Lineweaver-Burk- (A) bzw. als Eadie-Hofstee-Diagramm (B).

und pendelten sich im Laufe der Reaktion auf einen Wert von ca. 0.2 bis 0.25 Molen Diplopterol je Mol Hopen ein. Diplopterol bzw. Hopen konnten in entsprechend durchgeführten Standardinkubationen nicht umgesetzt werden.

6.5. Eigenschaften der Squalencyclase

Die Eigenschaften des Squalen cyclisierenden Enzyms aus *Bacillus acidocaldarius* wurden in ultraschallhomogenisierten Zellen, gereinigten Membranen und/oder tritonfreiem Solubilisat untersucht.

6.5.1. Sauerstoffbedarf der Squalencyclisierung

Um zu zeigen, daß die Squalencyclisierungsreaktion in *Bacillus acidocaldarius* keinen Sauerstoff benötigt, wurden Standardinkubationen (Ultraschallhomogenat mit ca. 1.3 mg Protein pro Test, Inkubationen in 0.1 M Kaliumphosphat, pH 7.4) unter Sauerstoffausschluß durchgeführt. Dazu wurden alle Inkubationsbestandteile auf Eis gemischt, luftdicht verschlossen und mit Stickstoff gesättigt, indem die Suspension mittels einer durch die Teflondichtung gesteckten Kanüle ca. 3 min mit N_2 durchperlt wurde. Durch Aufheizen der Proben auf 60 °C wurde die Reaktion gestartet. Gegenüber luftgesättigten Kontrollen zeigte die Squalencyclase in sauerstofffreier Lösung keine Änderung ihrer Enzymaktivität.

6.5.2. Einfluß von Detergenzien auf die Squalencyclase-Aktivität

Da Detergenzien dem Enzymtest zum notwendigen Emulgieren des Squalens zugesetzt werden mußten, lag es nahe, ihren Einfluß auf die Aktivität der Squalencyclase zu untersuchen. Neben Triton X-100 wurden Tween 80 und Natriumdeoxycholat bzw. Natriumtaurodeoxycholat auf ihre Wirkung auf das Enzym im Ultraschallhomogenat, in gereinigten Membranen und in tritonfreiem Solubilisat der Membran getestet.

6.5.2.1. Detergenzeinfluß im Ultraschallhomogenat

Abbildung 16 zeigt, daß Detergenzien starken Einfluß auf den Squalenumsatz in *B.a.*-Ultraschallhomogenat ausübten. Wurde Squalen im getesteten Detergenz emulgiert (Abb. 16 A), konnten bei den geringen Detergenzkonzentrationen, die mit unvollständiger Substratemulgierung verbunden waren, nur kleine Squalencyclisierungsraten gemessen werden. Mit Tween 80 zeigte die Squalencyclase die geringste Detergenzabhängigkeit, aber auch die niedrigsten Optimal-

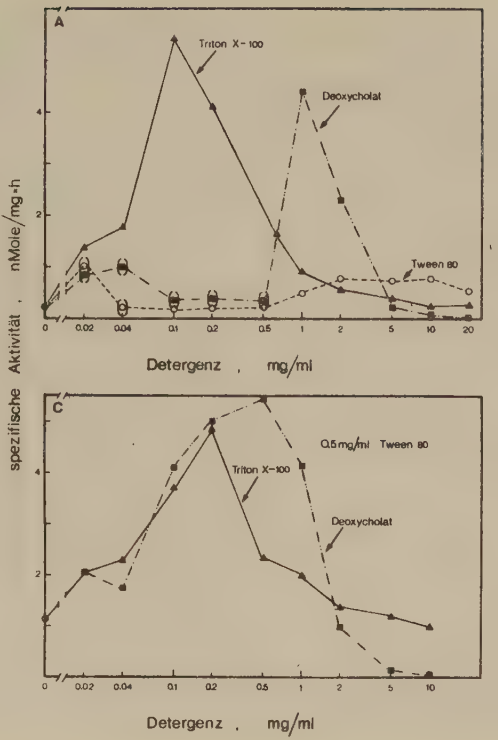


Abb. 16 : Einfluß verschiedener Detergenzien auf die Squalencyclase-Aktivität in *B.a.*-Ultraschallhomogenat

2h-(A), 3h-(B) bzw. 3.75h-Standardinkubation (C) von Ultraschallhomogenat (ca. 1.6(A), 0.26(B) bzw. 0.12 mg Protein (C)) in 0.1 M Kaliumphosphat, pH 7.4; Squalen im getesteten Detergenz (A),in Triton X-100 (B; Endkonzentration 0.1 mg/ml) bzw. in Tween 80 (C; Endkonzentration 0.5 mg/ml) emulgiert.

Eingeklammerte Symbole bedeuten unvollständige Squalenemulgierung.

squalenumsätze, die jedoch durch zusätzliches Triton X-100 oder Natriumdeoxycholat stark gesteigert werden konnten (Abb. 16 C). Die Natriumdeoxycholat-Abhängigkeit der Cyclisierungsreaktion wurde von den schlechten Emulgierungseigenschaften dieser Substanz geprägt (Abb. 16 A), denn erst oberhalb 1 mg/ml im Test (d.h. 10 mg/ml für die Squalen-Stammemulsion) konnte das Squalen quantitativ in Lösung gehalten werden. Die bei dieser Konzentration erzielten Umsatzraten erreichten fast den mit Triton X-100 erlangten Maximalwert. Dieser wurde schon bei sehr kleinen Detergenzkonzentrationen erreicht (0.1 mg/ml Triton X-100 im Test), ohne daß die Substratemulgierung Schwierigkeiten machte. Testete man die Squalencyclase bei tritonemulgiertem Substrat unter Zusatz anderer Detergenzien, so hemmte Tween 80 das Enzym, während durch Natriumdeoxycholat der Squalenumsatz noch gesteigert werden konnte.

6.5.2.2. Detergenzeinfluß in Membranen

Triton X-100-Abhängigkeitsmessungen der Squalencyclase-Aktivität in gereinigten *B.a.*-Membranen zeigten, daß abhängig vom Proteingehalt der Probe optimale Cyclisierungsraten bei verschiedenen Tritonkonzentrationen erreicht wurden (Abb. 17). Maximalumsatz wurde, unabhängig von der Membranproteinkonzentration, bei einem Verhältnis von ca. 0.4 mg Triton X-100 je mg Membranprotein erreicht.

6.5.2.3, Detergenzeinfluß im tritonfreien Solubilisat

Die Aktivität der Squalencyclase zeigte auch im tritonfreien Solubilisat von *B.a.*-Membranen eine deutliche Detergenzabhängigkeit. Unabhängig von der eingesetzten Proteinkonzentration wurden mit Triton X-100 optimale Substratumsätze bei ca. 0.2 bis 0.4 mg/ml Detergenz im Test erzielt (Abb. 18 A). Zusätzliche Gabe von Natriumtaurodeoxycholat vermochte die Enzymaktivität noch weiter zu steigern (Abb. 18 B).

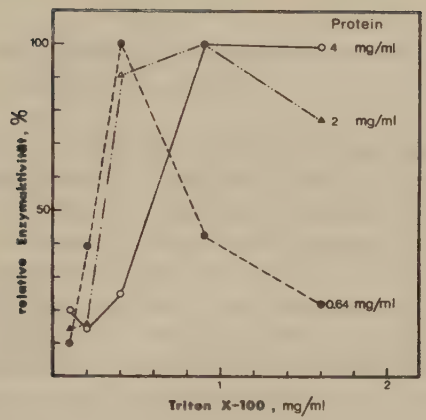


Abb. 17 : Einfluß von Triton X-100 auf die Squalencyclase-Aktivität in *Bacillus acidocaldarius*-Membranen

15 min-Standardinkubationen mit *B.a.*-Membranen verschiedener Proteinkonzentration in 10 mM Natriumcitrat, pH 6. Die Proben wurden vor Zugabe des Substrats (10fach konzentriert in Puffer mit 1 mg/ml Triton X-100) ca. 5 min bei 60 °C in Anwesenheit der restlichen Detergenzmenge vorinkubiert.

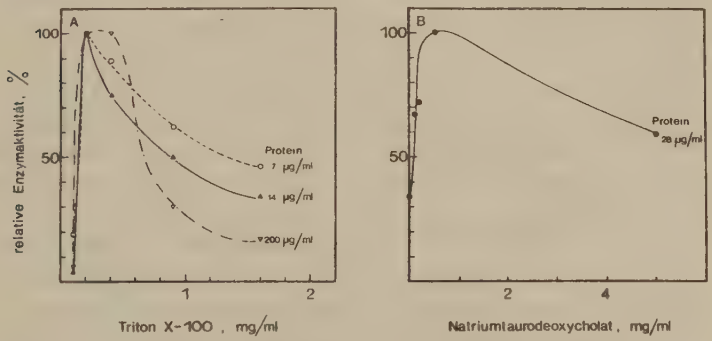


Abb. 18 : Einfluß verschiedener Detergenzien auf die Squalencyclase-Aktivität in tritonfreiem Solubilisat von *B. acidocaldarius*-Membranen

Standardinkubationen (A: 2h, B: 1h)in 100 mM Natriumcitrat, pH 6; 5min-Vorinkubation vor Substratzugabe (10fach konzentriert in Puffer mit 1 (A) bzw. 2 mg/ml (B) Triton X-100; maximal ca. 200(A) bzw.280(B) nMole Umsatz/mg.h).

6.5.3. Einfluß der Ionenstärke auf die Squalencyclase-Aktivität

Erhöhen der Ionenstärke durch steigende Mengen KCl bzw. Wechsel von 10 auf 100 mM Puffer führte zu einer Abnahme der Squalencyclase-Aktivität, solange unter optimalen Tritonkonzentrationen gemessen wurde. Dies galt sowohl für das Ultraschallhomogenat der *B.a*-Zellen (Abb. 19 A) als auch für das tritonfreie Solubilisat der Membran (Abb. 19 B). Wurde die angereicherte Squalencyclase im Solubilisat jedoch unter suboptimalen Tritonkonzentrationen getestet, konnte der Squalenumsatz durch Erhöhen der Ionenstärke noch gesteigert werden, erreichte aber nicht den bei optimalen Detergenzkonzentrationen erreichten Wert (Abb. 19 B). Bei gleicher Änderung der Ionenstärke (0 auf 0.8 M KCl in 10 mM Puffer) wurde das Enzym im Ultraschallhomogenat zu 97%, im Solubilisat zu 55% gehemmt.

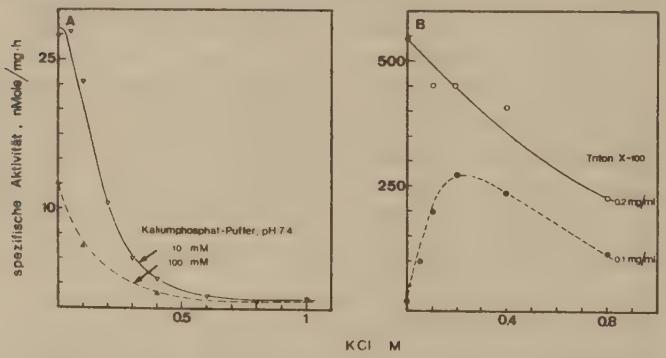


Abb. 19 : Ionenstärke-Abhängigkeit der Squalencyclase aus *Bacillus acidocaldarius*

A: Ionenstärke-Abhängigkeit in Ultraschallhomogenat (ca. 0.26 mg Protein); 3h-Standardinkubation in 10 bzw. 100 mM Kaliumphosphat, pH 7.4, 0.1 mg/ml Triton X-100 im Test.

B: Ionenstärke-Abhängigkeit in tritonfreiem Solubilisat (ca. 28 µg Protein); 1h-Standardinkubation in 10 mM Natriumcitrat, pH 6, 0.2 bzw. 0.1 mg/ml Triton X-100 im Test.

6.5.4. Einfluß gruppenspezifischer Reagenzien auf die Squalencyclase-Aktivität

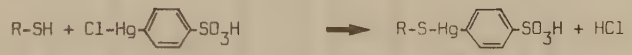
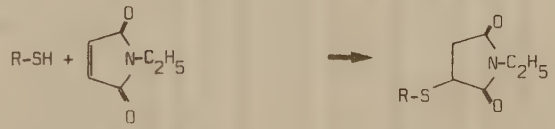
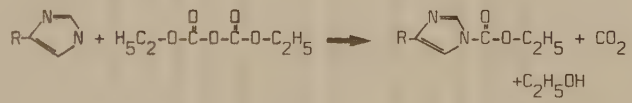
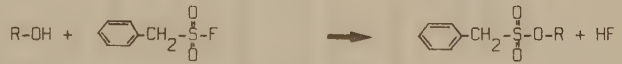
Um Hinweise zur Struktur der Squalencyclase aus *Bacillus acidocaldarius* zu erhalten, wurde der Einfluß gruppenspezifischer Reagenzien (Tab. 6) auf die Aktivität dieses Enzyms untersucht. Die Ergebnisse sind in Tabelle 7 zusammengefaßt.

Ein starker Rückgang der Squalencyclase-Aktivität konnte durch Zusatz von SH-reaktiven Reagenzien erzielt werden : In zellfreiem Ultraschallhomogenat führte 1 mM p-Chlormercuribenzolsulfonsäure (Natriumsalz) zu 96%iger Inaktivierung des Enzyms. N-Ethylmaleimid bewirkte eine deutliche Abnahme der Aktivität des Enzym in tritonfreiem Solubilisat der *B.a.*-Membran, sofern die Vorinkubation mit dem SH-Reagenz bei 60 °C durchgeführt wurde. Vorinkubationen bei Raumtemperatur, bevor das überschüssige Reagenz durch Cysteinzugabe abgefangen wurde, verursachte keine Änderung des in der anschließend gestarteten Enzymreaktion erzielten Squalenumsatzes. Versuche,die Squalencyclase durch Gegenwart hoher Konzentrationen ihres Substrats (500µM Squalen) vor der Modifikation durch N-Ethylmaleimid zu schützen, schlugen fehl. Eine solche Schutzmöglichkeit hätte es erlaubt nach Modifikation der übrigen Proteine durch nicht-radioaktives N-Ethylmaleimid und anschließendes Substratentfernen, die Squalencyclase selektiv mit radioaktivem Modifikator zu markieren. Zusatz von Spuren dieses modifizierten Enzyms zum Solubilisat der Membranen hätten ein Verfolgen von Reinigungsschritten ohne Enzymtest möglich gemacht.

Als Histidylreagenz zeigte Diethylpyrocarbonat eine starke Hemmung: Schon bei Zusatz von 0.1 mM Konzentrationen dieses Stoffes wurde die Squalencyclase zu 81% inhibiert.

Das Serylgruppen modifizierende Reagenz Phenylmethansulfonylfluorid konnte die Squalencyclase-Aktivität nicht beeinflussen.

Tab. 6 : Gruppenspezifische Proteinreagenzien und deren Reaktionen (nach MEANS & FEENEY, 1971)

Reagenz	Angriffsort	Reaktion
p-Chlormercuribenzol-sulfonsäure (PCMBS)	Sulfhydrylgruppen	
N-Ethylmaleimid (NEM)	Sulfhydrylgruppen	
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Histidylgruppen	
Phenylmethansulfonyl-fluorid (PMSF)	Serylgruppen	

Tab. 7 : Einfluß gruppenspezifischer Reagenzien auf die Squalencyclase-Aktivität

Reagenz	Konzentration	Hemmung der Squalencyclase
p-Chlormercuribenzolsulfonsäure (PCMBS)[a]	1 mM	96 %
N-Ethylmaleimid (NEM)[b]	1 mM	20 %
	5 mM	65 %
Diethylpyrocarbonat (DEPC)[c]	0.1 mM	81 %
	1 mM	88 %
	5 mM	92 %
Phenylmethansulfonylfluorid (PMSF)[d]	0.1 mM	0 %
	1 mM	0 %

[a] 6h-Standardinkubation von zellfreiem Ultraschallhomogenat (ca. 0.9 mg Protein) in 0.1 M Natriumcitrat, pH 6, nach 20 min Vorinkubation in Gegenwart von PCMBS bei Raumtemperatur; ungehemmt ca. 4 nMole Umsatz/mg·h.

[b] 1h-Standardinkubation von tritonfreiem Solubilisat (ca. 20 µg Protein) in 0.1 M Natriumcitrat, pH 6. Nach 30 min Vorinkubation bei 60 °C in Gegenwart von NEM wurde überschüssiges Reagenz durch Zugabe von Cystein (Endkonzentration 10 mM) abgefangen, bevor die Enzymreaktion durch Substratzugabe gestartet wurde; ungehemmt ca. 550 nMole Umsatz/mg·h; Inkubationen unter Cysteinaber ohne NEM-Zusatz zeigten keine Änderung der Squalencyclase-Aktivität.

[c] 1h-Standardinkubation von tritonfreiem Solubilisat (ca. 14 µg Protein) in 0.1 M Natriumcitrat, pH 6, nach 20 min Vorinkubation bei Raumtemperatur in Gegenwart von DEPC, welches 0.2 M in Ethanol gelöst war (Stammlösung). Im Kontrollversuch wurde keine Hemmung durch Alkohol (maximal 2.5 % v/v) erzielt; ungehemmt ca. 400 nMole Umsatz/mg·h.

[d] 1h-Standardinkubation von tritonfreiem Solubilisat (ca. 28 µg Protein) in 0.1 M Natriumcitrat, pH 6, und 0.2 mg/ml Triton X-100 nach 20 min Vorinkubation bei Raumtemperatur in Gegenwart von PMSF, welches 0.1 M in Ethanol gelöst war(Stammlösung); d.h. maximal 1 % v/v Ethanol im Test; ungehemmt ca. 250 nMole Umsatz je mg und h.

6.5.5. Einfluß sonstiger Stoffe auf die Squalencyclase-Aktivität

AMO 1618 (Abb. 20), das die Sterolbiosynthese in Tabakpflanzen und Rattenleber durch Hemmung der Epoxysqualencyclase unterdrückt (DOUGLAS & PALEY, 1978), erwies sich auch für die Squalencyclase aus *Bacillus acidocaldarius* als ein wirksamer Inhibitor. Bereits 1 µM Konzentrationen dieses Stoffes hemmten die Cyclisierungsreaktion zu 78% (Abb. 21).

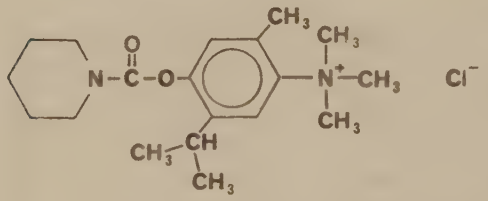


Abb. 20 : AMO 1618 ((2-Isopropyl-5-methyl-4-trimethylammoniumchlorid)-phenyl-1-piperidincarboxylat)

Als einziger squalenähnlicher Stoff wurde das Monoterpen Myrcen (Abb. 22) im Standardtest untersucht. Durch Gegenwart von 0.05 bis 50 mM Myrcen konnte die Squalencyclisierung nicht gehemmt werden. Trotz intensiver Bemühungen konnten substratähnlichere Stoffe wie z.B. Iminosqualen nicht besorgt werden.

Abb. 22 : Myrcen

Keinen Einfluß auf die Squalencyclisierung hatten 0.1 bis 2 mM EDTA und 0.1 bis 20 mM Dithiothreitol (DTT), weder im Ultraschallhomogenat noch in Membranen oder in Membransolubilisat.

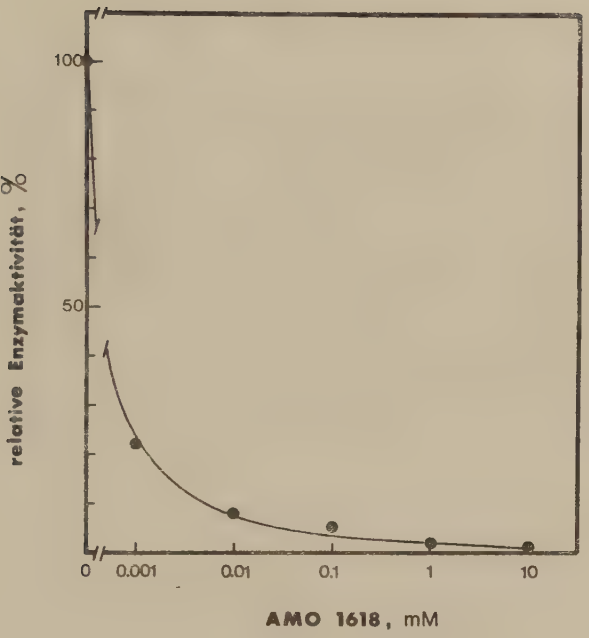


Abb. 21 : Hemmung der Squalencyclase aus *Bacillus acidocaldarius* durch AMO 1618

1h-Standardinkubation von tritonfreiem Solubilisat (ca. 28 µg Protein je Test) in 0.1 M Natriumcitrat-Puffer, pH 6, mit 0.2 mg/ml Triton X-100 und wechselnden Konzentrationen des Hemmstoffes, der 100 mM in 50% v/v Ethanol/Puffer gelöst war (Stammlösung). Bei Zugabe von reinen Ethanol-Puffer-Gemischen (d.h. kein AMO 1618) wurde keine Hemmung der Squalencyclase-Aktivität beobachtet. Ungehemmt wurden ca. 300 nMole Squalen je mg Protein und h umgesetzt.

7. ANREICHERUNG DER SQUALEN-HOPEN-CYCLASE

7.1. Reinigung der Cytoplasmamembran

Der erste Schritt zur Anreicherung der Squalen-Hopen-Cyclase aus *Bacillus acidocaldarius* resultierte aus der Lokalisation des Enzyms (vergl. 6.1.) und bestand aus der Isolierung der Cytoplasmamembran. Diese wurde durch Ultrazentrifugation der ultraschallbehandelten Lysozym-Protoplasten in leicht alkalischem Puffer niedriger Ionenstärke (10 mM Tris/HCl, pH 8) gewonnen. Dabei konnten aus 20 g nassen, logarithmisch gewachsenen Zellen ca. 400 mg Membranprotein erhalten werden, wobei 75% des Proteins, aber keine Squalencyclase-Aktivität mit dem Ultrazentrifugationsüberstand des zellfreien Ultraschallhomogenats abgetrennt wurden(vergl. Tab.8). Direkte Ultraschallbehandlung der Zellen ohne vorherigen Lysozym-Verdau führte zu gleichguter Membranproteinausbeute und Enzymanreicherung, sofern die Aufarbeitung der Zellen im gleichen Puffer durchgeführt wurde, denn nur unter den leicht alkalischen Bedingungen konnten bis zu 3/4 des Gesamtproteins mit dem Ultrazentrifugationsüberstand abgetrennt werden. Beide Methoden der Membranpräparation wurden als erster Schritt zur weiteren Anreicherung der Squalencyclase angewandt.

7.2. Solubilisierung der Squalencyclase

Nach Isolierung der Cytoplasmamembran wurde die Squalencyclase durch Detergenzbehandlung der Membran bei 60 °C mit 0.2 - 0.3 mg Triton X-100 je mg Membranprotein (Proteinkonzentration ca. 10 - 15 mg/ml) in den Ultrazentrifugationsüberstand überführt (vergl. 6.2.). Da unter den Solubilisierungsbedingungen nur etwa 10 bis 15% des Membranproteins von der Membran abgelöst wurden, konnte das Enzym durch die Solubilisierung etwa 7- bis 10fach gegenüber seiner membrangebundenen Form angereichert werden.

7.3. DEAE-Cellulose-Chromatographie des Solubilisats

Das aus *B.a.*-Membranen solubilisierte Enzym konnte bei niedriger Ionenstärke (10 mM Natriumcitrat) an DEAE-Cellulose zurückgehalten werden, während es in konzentrierterem Puffer (50 mM)nicht an den Anionenaustauscher gebunden wurde. Die Bindung erfolgte in 10 mM Natriumcitrat bei pH 6.5 vollständiger (ca. 98%) als im gleichen Puffer bei pH 6 (ca. 90%). Bei Chromatographie in detergenzfreiem Puffer - dazu wurde das detergenzhaltige Solubilisat durch XAD 2-Chromatographie von restlichem Triton X-100 befreit - wurden ca. 85% des solubilisierten Proteins und mehr als 95% der Squalencyclase - Aktivität an den Ionenaustauscher gebunden. Die Elution von etwa 75% der aufgetragenen Enzymaktivität erfolgte in Puffer mit 300 - 500 mM NaCl-Zusatz und wurde von ca. 50%iger Ablösung des ingesamt gebundenen Proteins begleitet.

Eine bessere Trennung von solubilisiertem Protein und Squalencyclase-Aktivität konnte durch DEAE-Cellulose-Chromatographie in tritonhaltigem Puffer erzielt werden, da die gebundene Squalencyclase schon bei 25 - 50 mM NaCl-Zusatz zusammen mit nur etwa 10 - 15% des aufgetragenen Proteins eluiert werden konnte. Abbildung 23 zeigt das Elutionsprofil einer solchen DEAE-Chromatographie der Squalencyclase. Durch diese Anionenaustausch-Chromatographie gingen in der Regel ca. 65% der aufgetragenen Squalencyclase-Aktivität verloren; dennoch konnte sie durch diesen Schritt um Faktor 5.5 gegenüber dem Solubilisat angereichert werden (vergl. Tab. 8).

7.4. Zusammenfassung der Squalencyclase-Anreicherung

Tabelle 8 faßt die verschiedenen Schritte zur Anreicherung der Squalencyclase aus *Bacillus acidocaldarius* zusammen. Die vereinigten Fraktionen des Enzyms nach der DEAE-Cellulose-Chromatographie wurden durch hydrophobe Chromatographie an Polystyrol-Divinylbenzol-Copolymer

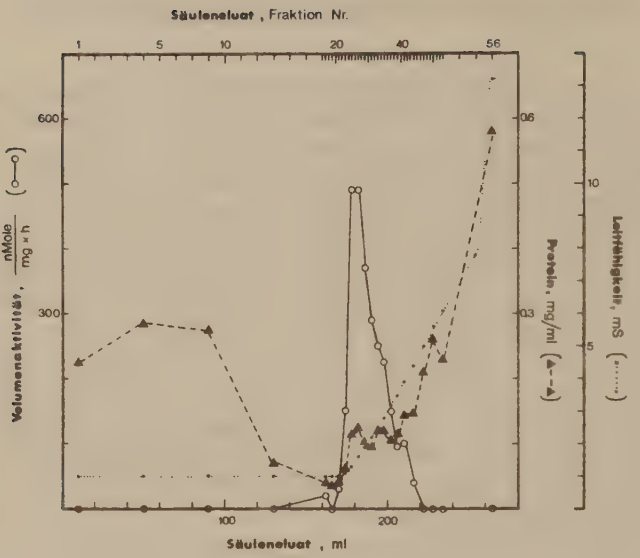


Abb. 23 : DEAE-Cellulose-Chromatographie von *Bacillus acidocaldarius*-Membransolubilisat

Chromatographie von ca. 50 mg tritonsolubilisiertem Membranprotein an ca. 20 ml Servacel DE 23 SH (Säule:6.4 cm lang mit einem Durchmesser von ca. 2 cm) in 10 mM Natriumcitrat, pH 6.5, mit 1 mg/ml Triton X-100. Nach Waschen mit zwei Säulenvolumen Puffer wurden die gebundenen Proteine mit etwa 80 ml eines linearen NaCl-Gradienten (0 - 200 mM) und anschließenden 30 ml einer 500 mM NaCl-Stufe eluiert. Fraktionen à 10 ml (Fraktionen 1 - 15 und 54 - 56) bzw. à 2 ml (Fraktionen 16 - 53) wurden gesammelt. Von insgesamt 22 Fraktionen wurden Leitfähigkeit, Proteingehalt und Squalencyclase-Aktivität bestimmt. Für den Enzymtest wurden jeweils 10 µl der Fraktion in 30-minütige Standardinkubationen in 100 mM Natriumcitrat, pH 6, eingesetzt.

(Servachrom XAD 2; Schütteln von 6 g XAD mit 30 ml DEAE-Eluat und anschließendes Waschen des Harzes mit 14 ml 0.1 M Natriumcitrat, pH 6.5) von Detergenz befreit. Die dabei entstandene leichte Trübung der Lösung konnte durch Ultrazentrifugation beseitigt werden, wodurch etwa 3% der Squalencyclase und 30% des Proteins sedimentiert wurden. Bis zu

Tab. 8 : Anreicherung der Squalencyclase aus *Bacillus acidocaldarius*

Probe	Volumen	Protein-konzentration	Gesamt-protein	Squalencyclase-Aktivität	Anreicherungs-faktor gegenüber dem zellfreien Ultraschallhomogenat	Gesamtaktivität der Squalencyclase	Ausbeute
	ml	mg/ml	mg	nmol/mg·h		nmol/h	%
zellfreies Ultraschall-homogenat (in 10mM Tris/HCl, pH 8)	620	4.05	2511	13	-	32240	100
Ultrazentrifugationsüberstand (Cytosol in 10mM Tris/HCl, pH 8) und Waschüberstände (in 1omM Natriumcitrat, pH 6)	600 300	2.80 0.60	1860	-	-	-	-
Membranen (in 10mM Natriumcitrat, pH 6)	60	7.70	462	59	4.5	27258	85
Ultrazentrifugationsniederschlag nach Triton X-100-Behandlung (Restmembranen in 10mM Natriumcitrat, pH 6,mit Triton)	60	6.90	414	6	0.5	2484	8
Membransolubilisat (in 10mM Natriumcitrat, pH 6)	120	0.43	52	640	49	33280	103
tritonfreie (durch XAD-Chromatographie) Squalencyclase-Fraktion nach der DEAE-Chromatographie (in 10mM Natriumcitrat, pH 6.5, ca. 50 mM NaCl)	44	0.07	3.1	3462	266	10732	33

diesem Schritt konnte die Squalencyclase - trotz Verlust von ca. 65% ihrer Enzymaktivität durch die Ionenaustauschchromatographie - 270fach gegenüber dem zellfreien Ultraschallhomogenat angereichert werden.

Konzentrieren der Enzympräparation durch Ultrafiltration führte bei quantitativer Proteinretention zu einem Verlust von weiteren 50% der verbliebenen Squalencyclase-Aktivität. Diese Aktivitätseinbußen konnten auch durch Arbeiten in Gegenwart von 0.1 mM Dithiothreitol (DTT) und 1 mM EDTA nicht unterdrückt werden.

Bei der Gelfiltration von 2 ml des Enzymkonzentrats an Sephadex G 100 (Säule mit ca. 78 cm Höhe und 1.5 cm Durchmesser), welches bis zu M_r=150000 auftrennt, wurde die Squalencyclase-Aktivität bei Chromatographieren in 0.1 M Natriumcitrat, pH 6.5 mit dem Ausschlußvolumen der Säule eluiert (ca. 21 ml; bestimmt mit Dextranblau). Auch diese Chromatographie war von erheblichem Verlust an spezifischer Enzymaktivität begleitet. Weder im Ultrafiltrationskonzentrat noch im G 100-Eluat konnte die verlorene Squalencyclase-Aktivität durch Zugabe von abgekochtem *B.a.*-Ultraschallhomogenat zurückgewonnen werden.

Abbildung 24 zeigt die elektrophoretische Auftrennung der Proteingemische nach den einzelnen Reinigungsschritten im diskontinuierlichen SDS-Gel. Beim Vergleich des Proteinmusters der Membran mit dem der tritonsolubilisierten Proteine war eine Anreicherung von Proteinen mit M_r = 108000, 75000, 50000, 49000, 45000 und 36000 zu erkennen, von denen jedoch nur das Protein mit M_r=75000 durch die DEAE-Chromatographie deutlich weiter angereichert wurde. Auf der Höhe des zweiten Hauptproteins der Squalencyclase-Fraktion nach dem Ionenaustauscher (M_r=39000) war sowohl in der Membran als auch in der Restmembran eine deutliche Bande gleichen relativen Molekulargewichts zu erkennen.

Um zu beweisen, daß das Protein mit M_r=75000 mit der Squalencyclase aus *Bacillus acidocaldarius* identisch ist, wurden zwei Mäuse bzw. ein Kaninchen mit der Serva Blau-gefärbten , homogenisierten Bandes dieses Proteins im SDS-Gel

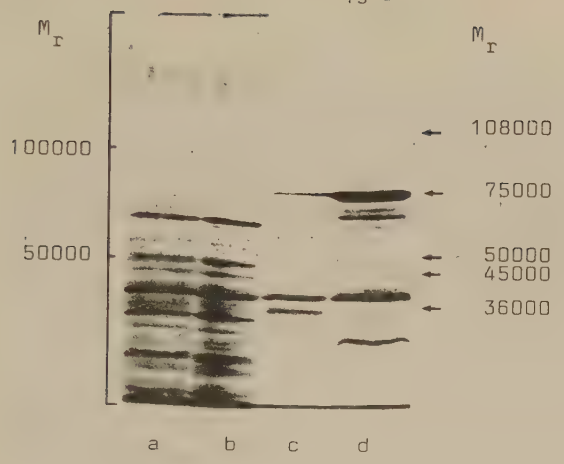


Abb. 24 : SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese nach verschiedenen Schritten zur Anreicherung der Squalencyclase aus *Bacillus acidocaldarius*

10%iges SDS-Polyacrylamid-Gel von je ca. 40 µg Protein, mit Serva Blau R 250 auf Protein angefärbt.

a : Membranen

b : Restmembranen nach Triton X-100-Solubilisierung

c : Membransolubilisat

d : Squalencyclase-Fraktion nach DEAE-Chromatographie

immunisiert (Mäuse: 2fach-Immunisierung intraperitonal mit je ca. 20 µg Protein; Kaninchen: 2fach-Immunisierung dorsal intradermal mit je ca. 80 µg Protein; Injektionen in ca. 2 Wochen Abstand). Die Squalencyclisierung konnte durch keines der erhaltenen Antiseren inhibiert werden. Daß keine erkennbaren Mengen an Antikörpern gegen das gespritzte Protein (M_r=75000) gebildet wurden, zeigte auch die Inkubation des auf Nitrocellulosefilter elektrotransferierten SDS-Polyacrylamid-Gels von angereichertem Enzym mit den Antiseren: Nach Sekundärinkubation mit enzymmarkiertem Ziegen-anti-Maus- bzw. -anti-Kaninchen-IgG-Antikörpern konnten nach Entwickeln mit Substrat keine Unterschiede in der Anfärbung der potentiellen Squalencyclase zwischen den Antiseren

und dem entsprechenden Maus-Normalserum bzw. Kaninchen-Präimmunserum gefunden werden. Eine sehr schwache Immunantwort gegen zwei höhermolekulare Proteinbanden - vermutlich durch Verunreinigung des Antigens mit proteolytischen Abbauprodukten dieser Proteine verursacht - war in den Mäuse-Antiseren zu erkennen.

Die fehlende Immunantwort gegen das gespritzte Protein (M_r=75000) machte die immunologische Beweisführung für die Identität dieses Proteins mit der Squalencyclase unmöglich.

IV. DISKUSSION

Zur Durchführung der hier beschriebenen Untersuchungen am Squalen cyclisierenden Enzym aus *Bacillus acidocaldarius* war es Voraussetzung, einen geeigneten Enzymtest zu entwickeln, der es ermöglicht, die Bildung der beiden Cyclisierungsprodukte, Hopen und Diplopterol, quantitativ zu erfassen.

Der für das untersuchte Enzym erstellte Enzymtest zeigt den für vergleichbare Systeme (Epoxysqualencyclasen: DEAN, 1969; BEASTALL et al., 1971; SAAT & BLOCH, 1976; Squalencyclasen: ZANDER et al., 1970; ROHMER et al., 1980 a) üblichen Aufbau aus Inkubation mit dem radioaktiv markierten Substrat, organischer Extraktion und dünnschichtchromatographischer Trennung von Substrat und Produkten mit anschließender Quantifizierung durch Flüssigszintillationszählung der ausgekratzten Dünnschichtchromatographie-Flecken.

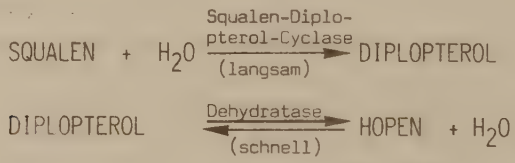
Mit dem entwickelten Enzymtest läßt sich die Squalencyclase-Reaktion selbst im Rohhomogenat der Zellen messen, ohne daß die beiden Reaktionsprodukte, Hopen und Diplopterol, weiter umgesetzt würden. Vermutlich ist für die Weiterreaktion zum Polyol ein energiereiches Substrat, wahrscheinlich Phosphoribosylpyrophosphat (LANGWORTHY & MAYBERRY, 1976), erforderlich. Das Ausbleiben einer weiteren Umsetzung der Reaktionsprodukte vereinfacht zudem die Aufarbeitung des Inkubationsansatzes nach Stoppen der Enzymreaktion, denn es macht die alkalische Methanolyse überflüssig, die in allen Epoxysqualencyclase-Testsystemen notwendig ist, um gebildete Ester extrahierbar zu machen (SCALLEN et al., 1968; DEAN, 1969; BEASTALL et al., 1971; SAAT & BLOCH, 1976).

Substrat und Produkte sind somit direkt einer Extraktion mit organischen Lösungsmitteln zugänglich. Diese wurde im vorliegenden Fall mit einer Kombination aus n-Hexan und Isopropanol (HARA & RADIN, 1978) durchgeführt, einer Lipidextraktionsmethode, die, im Vergleich zum Aus-

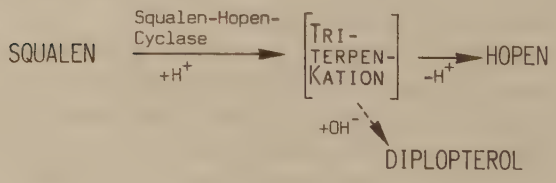
schütteln mit dem üblichen Chloroform-Methanol-Gemisch (BLIGH & DYER, 1959) neben einer schnelleren und quantitativen Überführung von Substrat und Produkten in die organische Phase und einer schnelleren Phasentrennung auch den Vorteil geringerer Toxizität der verwendeten Lösungsmittel bietet. Da säulenchromatographisch keine Trennung von Squalen und seinen Cyclisierungsprodukten erzielt werden konnte, mußte zu ihrer Separation auch im vorliegenden Fall auf die Dünnschichtchromatographie zurückgegriffen werden, die Methode, die auch bei allen vergleichbaren Systemen ausschließlich angewendet wird (DEAN, 1969; ZANDER et al., 1970; BEASTALL et al., 1971; SAAT & BLOCH, 1976; ROHMER et al., 1980a,b; BOUVIER et al., 1980).

Diplopterol und Hopen konnten massenspektrometrisch als die beiden Produkte identifiziert werden, die von *Bacillus acidocaldarius*-Zellhomogenat aus Squalen gebildet werden. Beide Cyclisierungsprodukte werden - unabhängig von wechselnden Testbedingungen und unterschiedlichem Anreicherungsgrad des Enzyms - stets in einem etwa konstanten Verhältnis von 1 Mol Diplopterol zu 4 bis 5 Molen Hopen gebildet. Ihre Biosynthese aus Squalen könnte sequentiell, mit Diplopterol als Zwischenprodukt (A),oder parallel (B) erfolgen:

A



B



Beim sequentiellen Reaktionsmechanismus (A) würde der offensichtlich geschwindigkeitsbestimmenden Cyclisierung des Squalens zum Diplopterol eine schnelle Gleichgewichtseinstellung (molares Diplopterol-zu-Hopen-Verhältnis 0.2 bis 0.25) in der Dehydratisierungsreaktion zum Hopen folgen.Die Tatsache, daß auch nach fast 300facher Anreicherung der Enzymaktivität keine Trennung von Einzelaktivitäten erzielt werden konnte, favorisiert einen Ein-Enzym-Mechanismus gegenüber einer durch zwei einzelne Enzyme katalysierten Reaktionsfolge. Für den sequentiellen Reaktionsmechanismus sprächen die beobachteten, gegenüber dem scheinbaren Gleichgewichtswert leicht erhöhten Werte des Diplopterol-zu-Hopen-Verhältnisses bei sehr kurzen Reaktionen mit wenig Substratumsatz, Bedingungen, unter denen allerdings besonders die Bestimmung der Diplopterolmenge mit recht großem Fehler behaftet ist. Auch ergäbe sich für die Dehydratase-Reaktion unter Testbedingungen (60 °C, pH 6) mit - 4.2 kJ/mol eine freie Energie ($\Delta G=-RT\ln K$), die in der Größenordnung der Werte für vergleichbare Wasserabspaltungsreaktionen (z.B. die Teilreaktion der Aconitase vom Isocitrat zum cis-Aconitat mit -2.1 kJ/mol; STRYER, 1981) läge. Vergleichbare Ein-Enzym-Sequenzreaktionen wurden z.B. für die Aconitase und die Tryptophan-Synthetase beschrieben (DICKMAN, 1961; YANOFSKY & CRAWFORD, 1972). Im Fall der Thryptophan-Synthetase konnte erst durch Umsatz des postulierten Zwischenproduktes Indol die Existenz desselben bestätigt werden, da es in Gegenwart von Serin während des Gesamtumsatzes vom Indol-3-Glycerinphosphat zum Tryptophan nicht nachweisbar ist (YANOFSKY & CRAWFORD, 1972). Zugesetztes Diplopterol konnte durch die hier untersuchte Squalencyclase weder in Hopen noch in Squalen umgewandelt werden. Ebenso wurde auch Hopen nicht als Enzymsubstrat akzeptiert. Dies spricht ebenso gegen eine Gleichgewichtsreaktion zwischen Diplopterol und Hopen wie das Ergebnis, daß im Zellhomogenat von *Acetobacter pasteurianum* nach längeren Inkubationen (4 h) beide Hopanoide etwa im Verhältnis 1:1 und nicht, wie beim *Bacillus acidocaldarius*-Enzym beobachtet, im Verhältnis von etwa 1:5 bis

1:4 (Diplopterol : Hopen) gebildet werden (ROHMER et al., 1980a). Der sequentielle Reaktionsmechanismus erscheint daher sehr unwahrscheinlich.

Vermutlich handelt es sich bei dem gebildeten Diplopterol um ein Nebenprodukt einer stark exergonen Cyclisierungsreaktion vom Squalen zum Hopen (vergl. Mechnismus B, Seite 78), in deren Verlauf der Übergangszustand des Carbokations je nachdem, ob Wasser bzw. Hydroxylionen anwesend sind oder nicht, durch OH^--Anlagerung in Diplopterol oder durch H^+-Abspaltung in Hopen umgewandelt wird. Während die Squalencyclase aus *Bacillus acidocaldarius* in vivo offensichtlich nur einen geringen Teil Diplopterol bildet - Diplopterol macht nur etwa 1% aller *B.a.*-Lipide aus (ROHMER et al., 1984) - scheint die Diplopterol-Biosynthese in vitro mit höherer und etwa konstanter Wahrscheinlichkeit abzulaufen, vielleicht verursacht durch eine in vitro gesteigerte Wasser- oder OH^--Zugänglichkeit des Enzym. Eine paralelle Bildung von Hopen und Diplopterol durch ein einziges Enzym würde auch erklären, warum während der Anreicherung des Enzyms keine Trennung von Teilaktivitäten erzielt wurde. Doch wird ein weiterer möglicher Reaktionsmechanismus, die paralelle Bildung der beiden Produkte durch zwei verschiedene Enzyme, erst nach vollständiger Reinigung des Enzyms endgültig auszuschießen sein.

Eine Unspezifität in Bezug auf die katalysierte Reaktion wurde für die β_2-Untereinheit der Tryptophan-Synthetase aus *E.coli* beschrieben (YANOFSKY & CRAWFORD, 1972). Diese katalysiert die Reaktionen

(1) Serin + ß-Mercaptoethanol $\xrightarrow[\text{(Pyridoxalphosphat)}]{k_1}$ S-Hydroxymethylserin + H_2O

(2) Serin + ß-Mercaptoethanol + Pyridoxalphosphat $\xrightarrow{k_2}$ S-Pyruvylmercaptoethanol + Pyridoxaminphosphat + H_2O

bei Abwesenheit der α_2-Untereinheit und von NH_4^+-Ionen in einem Verhältnis von 38:1 (k_1:k_2), während durch Zugabe

von Ammoniumionen oder α-Untereinheiten die zweite Reaktion völlig unterdrückt wird (YANOFSKY & CRAWFORD, 1972). Ähnlich wie in diesem Fall die veränderten katalytischen Eigenschaften der Tryptophansynthetase durch die fehlende Fixierung der β_2-Untereinheit durch die α-Untereinheiten erklärt werden, könnte bei der untersuchten Squalencyclase eine räumlich weite, lockere Substratbindungsstelle , eventuell der Membranoberfläche genähert, eine Wasserbeteiligung an der Enzymreaktion ermöglichen. Für eine solche,etwas lockere Bindungsstelle spricht auch die Tatsache, daß die vergleichbaren Enzyme aus *Acetobacter rancens* und *Acetobacter pasteurianum* neben Squalen auch beide Stereoisomeren von Oxidosqualen cyclisieren, also Substratunspezifitäten aufweisen (ANDING et al., 1976; ROHMER et al.; 1980a). Aussagen über den möglichen Reaktionsmechanismus der Bildung der auch hier beobachteten Cyclisierungsprodukte,Hopen und Diplopterol, machen die Autoren nicht.

Die für die maximale Enzymaktivität der Squalencyclase aus *Bacillus acidocaldarius* ermittelten Testbedingungen, pH 6 und 60 °C, zeigen gute Übereinstimmung mit dem intrazellulären pH (pH 6; OSHIMA et al., 1977) und der optimalen Wachstumstemperatur dieses Bacillus' (60 bis 65 °C; DARLAND & BROCK, 1971). Damit kann *B.a.* seine Hopenbiosynthese beim Übergang zu höheren Temperaturen nur unwesentlich stärker steigern (Faktor 10 bei Erhöhen der Temperatur von 40 °C auf 60 °C), als es das schnellere Zellwachstum (Faktor 8 bei gleicher Temperaturerhöhung; DARLAND & BROCK, 1971) erforderlich macht. Dies könnte deshalb kaum einen Beitrag zur beobachteten Steigerung des Hopanglykolipid-Anteils der *B.a.*-Membran beim Übergang zu höheren Wachstumstemperaturen (PORALLA et al., 1984) liefern. Wahrscheinlich greift der Hauptregulationsmechanismus der Hopanoidbiosynthese, vielleicht durch Induktion vermittelt, erst nach der Squalencyclase-Reaktion ein, denn unter wechselnden Wachstumsbedingungen bleiben sowohl der Hopengehalt der Plasmamembran von *B.a.* (PORALLA et al.,

1984) als auch die spezifische Aktivität der Squalencyclase in der Membranfraktion unverändert.

Die Squalencyclase aus *Bacillus acidocaldarius* ist ein membrangebundenes Enzym, wie ihre vollständige Sedimentierbarkeit bei 105000 g zeigt. Sie teilt die partikuläre Lokalisation nicht nur mit der Squalen-Tetrahymanol-Cyclase aus *Tetrahymena pyriformis* (ZANDER et al., 1970), sondern auch mit den mikrosomal gebundenen Epoxysqualen cyclisierenden Enzymen aus Schweineleber (2,3-Oxidosqualen-Lanosterol-Cyclase; DEAN, 1969; YAMAMOTO et al., 1969), Erbsenkeimlingen (2,3-Oxidosqualen-β-Amyrin-Cyclase; DEAN, 1969) und *Ochromonas malhamensis*, einer einzelligen Alge (2,3-Oxisosqualen-Cycloartenol-Cyclase; BEASTALL et al., 1971). Im Gegensatz dazu scheinen die 2,3-Oxidosqualen-Lanosterol-Cyclase aus Hefe (SHECHTER et al., 1970) und die 2,3-22,23-Dioxidosqualen-α-Onocerin-Cyclase aus *Ononis spinosa*, der dornigen Hauhechel (ROWAN & DEAN 1972), zumindest nach dem Zellaufschluß nicht membrangebunden zu sein.

Die Bindung der Squalencyclase an die *B.a.*-Membran läßt sich unter Bedingungen, die das Ablösen vieler peripherer Membranproteine von ihrer Membran bewirken (PENEFSKY & TZAGOLOFF, 1971), nicht befriedigend aufheben : Weder niedrige noch hohe Ionenstärke, noch Zugabe von EDTA konnten mehr als 20% der Squalencyclase-Aktivität solubilisieren; Alkalisierung und Zusatz chaotroper Reagenzien führten zu einem drastischen Aktivitätsverlust des Enzyms. Wie bei den partikulären Epoxysqualencyclasen wurde ein Erfolg erst beim Einsatz von Detergenzien erzielt.

Die Höhe der zur Solubilisierung membrangebundener Enzyme notwendigen Detergenzkonzentration ist abhängig von der Menge an eingesetzter Membran, so daß nicht die eingesetzte Detergenzkonzentration sondern das Verhältnis von Detergenz zu Lipid oder Detergenz zu Membranprotein ausschlaggebend ist (HELENIUS & SIMONS, 1975). Dies konnte auch bei der Squalencyclase aus *Bacillus acidocaldarius* beobachtet werden, denn das Enzym wird ab einem konstanten

Verhältnis von etwa 0.2 mg Triton X-100 je mg Membranprotein zu mehr als 90% in den Ultrazentrifugationsüberstand überführt. Natriumdeoxycholat, das zur Solubilisierung der partikulären, Oxidosqualen cyclisierenden Enzyme verwendet wurde (DEAN et al., 1967; DEAN, 1969; BEASTALL et al., 1971), vermochte in einem ähnlichen Konzentrationsbereich (0.5 bis 2 mg je mg *B.a.*-Membranprotein im Vergleich zu 0.75 mg je mg Mikrosomenprotein; DEAN, 1969) auch die Squalencyclase aus *Bacillus acidocaldarius* zu 70% von der Cytoplasmamembran abzulösen. Diese Enzymsolubilisierung war jedoch von einer erheblichen Proteinfreisetzung (40%) begleitet. Darüber hinaus schließt der Gebrauch von Deoxycholat ein Arbeiten bei pH 6, dem pH-Optimum des Enzyms, aus, weil dieses Detergenz im leicht sauren Bereich auszufallen beginnt. Deshalb wurde im vorliegenden Fall eine Solubilisierungsmethode entwickelt, die, mittels Triton X-100, die Squalencyclase nahezu quantitativ von der Cytoplasmamembran freisetzt, während der weitaus überwiegende Teil der anderen Membranproteine sedimentierbar bleibt (80-90%). Auf diese Weise kann die Squalencyclase allein durch die Solubilisierung bis zu 10fach angereichert werden. Eine ebenso gute Anreicherung wird für die Epoxysqualencyclase aus Schweinelebermikrosomen erst durch eine Ammoniumsulfatfällung aus dem Deoxycholat-Solubilisat erzielt (DEAN et al., 1967); die spezifische Aktivität des entsprechenden Enzyms aus *Ochromonas malhamensis* wird durch Behandlung der Mikrosomen mit Deoxycholat nur etwa 2fach gesteigert (BEASTALL et al., 1971).

Zur fast quantitativen Solubilisierung der Squalencyclase aus *Bacillus acidocaldarius* reichen offensichtlich kleinere Detergenzkonzentrationen aus (0.2 mg Triton X-100 je mg Membranprotein), als sie zur Auflösung der Membranstruktur notwendig sind, denn diese beginnt erst ab ca. 1-2 mg Triton X-100 je mg Membranprotein (TZAGOLOFF & PENEFSKY, 1971; HELENIUS & SÖDERLUND, 1973; NAVARRETE & SERRANO, 1983; PRADO et al., 1983).Andererseits reichen schwache Störungen von ionischen bzw. hydrophoben Wechselwirkungen, die i.A. periphere, membranassoziierte Proteine

von der Membran ablösen können (PENEFSKY & TZAGOLOFF, 1971), offenbar nicht aus, um das Enzym in den Ultrazentrifugationsüberstand zu überführen. Deshalb ist anzunehmen, daß die Squalencyclase aus *Bacillus acidocaldarius* zu Teilen - wahrscheinlich , auf Grund des lipophilen Substrats, auch mit dem aktiven Zentrum - in die hydrophobe Lipiddoppelschicht eintaucht, ohne jedoch so stark in diese integriert zu sein, daß sie erst durch Auflösen der Membran freigesetzt werden könnte.

Die fehlende Wasserlöslichkeit vom Substrat der untersuchten Squalencyclase macht die generelle Anwesenheit von Detergenz im Inkubationsansatz des entwickelten Testsystems notwendig. Das Detergenz hat hierbei nicht nur Einfluß auf die Effektivität der Substratemulgierung, sondern auch auf die Lokalisation des Enzyms unter Testbedingungen und direkt auf die Enzymaktivität, die indirekt aber auch durch die beiden zuerst genannten Effekte moduliert werden kann. Die Interpretation von Detergenzabhängigkeiten wird zusätzlich noch dadurch kompliziert, daß die eingesetzte Detergenzkonzentration nicht mit der wirksamen Konzentration übereinstimmt, sobald Membranen anwesend sind, in die sich die Detergenzien - abhängig von ihrer kritischen Micellenkonzentration (cmc), d.h. ihren molekularen Eigenschaften - mit recht hohem Verteilungskoeffizienten einlagern (HELENIUS & SIMONS, 1975; HELENIUS et al., 1979).

Zur Substratemulgierung wäre deshalb besonders ein solches Detergenz geeignet, das zwar das Squalen in optimaler Form anbietet, aber, auch in hoher Konzentration, das Enzym nicht hemmt. Tween 80 wird in den meisten vergleichbaren Testsystemen als Emulgator eingesetzt (DEAN, 1969; SHECHTER et al., 1970; BEASTALL et al., 1971; SAAT & BLOCH, 1976; ROHMER et al., 1980a). Wechselnde Konzentrationen dieses Detergenz' hatten zwar kaum Einfluß auf die beobachtete *B.a.*-Squalencyclase-Aktivität, doch war diese im Vergleich zu Umsätzen in Gegenwart anderer Detergenzien auch besonders niedrig. Weitaus bessere Squa-

lencyclisierungsraten wurden erzielt, wenn, zusätzlich zu Tween 80, Triton X-100 bzw. Natriumdeoxycholat im Test anwesend waren. Da dies jedoch Detergenzien sind, die die Squalencyclase-Aktivität konzentrationsabhängig stark beeinflussen, würde ihre generelle zusätzliche Gabe im Enzymtest den Vorteil von Tween 80 - die geringe Enzymaktivitätsabhängigkeit in Gegenwart dieses Detergenz' - zunichte machen.

Unter den getesteten Stoffen konnten bei Emulgierung des Substrats mit Triton X-100 die besten Squalencyclisierungsraten beobachtet werden. Deshalb wurde dieses Detergenz zur Squalenemulgierung eingesetzt, obwohl es in höherer Konzentration die Squalencyclase hemmt.

Aus o.g. Gründen zeigt die Squalencyclase-Aktivität nur im tritonfreien Solubilisat - d.h. nur in Abwesenheit von Membranen - eine direkte Abhängigkeit von der eingesetzten Detergenz*konzentration*, während sie in Gegenwart von Membranen vom *Verhältnis* Detergenz zu Membranprotein beeinflußt wird. Dieser Effekt, der auch für die Squalenepoxidbildung in Hefen beschrieben wird (HATA et al., 1982), konnte auch für die Squalencyclisierung in der *B.a.*-Membranfraktion demonstriert werden.

Der in Versuchen mit Ultraschallhomogenat ermittelte Optimalwert für die Triton X-100-Konzentration (1 mg/ml zur Substratemulgierung; Endkonzentration im Test 0.1 mg/ml) gilt daher zwar nur für die getestete Proteinkonzentration (1.6 mg/ml), doch ist mit dieser Detergenzkonzentration ein Grenzwert erreicht, weil unterhalb dieser Konzentration 50 nMole Squalen nicht mehr zufriedenstellend emulgiert werden können. Suboptimale Testbedingungen in Bezug auf die Tritonkonzentration treten daher nur ein, wenn die Proteinkonzentration im Test den Wert von 1.6 mg/ml übersteigt. Diese Charakteristik der Tritonabhängigkeit schließt zwar eine direkte Vergleichbarkeit von Testergebnissen aus Inkubationen mit unterschiedlichem Membrangehalt aus, doch können innerhalb vergleichbarer Meßreihen zuverlässige Aussagen getroffen werden.

Im tritonfreien Solubilisat zeigte die *B.a.*-Squalencyclase, unabhängig von der eingesetzten Proteinkonzentration(7 - 200 µg/ml), maximale Umsatzraten bei 0.2 bis 0.4 mg/ml Triton X-100. Durch das Fehlen der detergenz- und substratbindenden Membran schien das Enzym tritonunempfindlicher geworden zu sein. Die in der Membranfraktion schon bei geringeren Tritonkonzentrationen eintretende Hemmung der untersuchten Enzymaktivität könnte deshalb darauf zurückzuführen sein, daß das Squalen für die unter Testbedingungen solubilisierte Squalencyclase nur unvollständig zugänglich ist, weil das Substrat im Test vermutlich z.T. membrangelöst vorliegt. Da optimale Umsatzraten in der Membranfraktion erst unter enzymsolubilisierenden Testbedingungen (Enzymsolubilisierung ab 0.2, optimaler Umsatz bei 0.4 mg Triton X-100 je mg Membranprotein) erzielt werden, scheint sich ein aktivitätssteigernder Effekt durch die Enzymfreisetzung mit hemmenden Einflüssen durch die substratbindende Membran einerseits, und durch eine direkte Enzymhemmung andererseits, zu überlagern. Eine direkte Enzymhemmung ist wahrscheinlich Ursache für die in tritonfreiem Solubilisat beobachtete Squalencyclase-Hemmung bei hohen Tritonkonzentrationen und ist möglicherweise durch Detergenzbindung an die hydrophobe Substratbindungsstelle des Enzyms zu erklären.

Für keines der vergleichbaren Testsysteme werden Detergenzabhängigkeiten des substratemulgierenden Agenz' beschrieben. Die Untersuchungen beschränken sich dort auf die Wirkung von anderen, dem Inkubationsansatz zusätzlich beigefügten, Detergenzien. Dabei wurden besonders Triton X-100 und Natriumdeoxycholat bei Tween 80-Emulgierung des Substrats getestet. Vergleichbare Untersuchungen wurden im zellfreien *B.a.*-Ultraschallhomogenat auch für die Squalencyclase durchgeführt. Wie die vergleichbaren Enzyme (SHECHTER et al., 1970; BEASTALL et al., 1971; ROWAN & DEAN, 1972) wird auch das untersuchte durch hohe Konzentrationen beider Detergenzien gehemmt. Niedrige Tritonkonzentrationen aktivieren die Squalencyclase. Sie teilt diese Eigenschaft mit der als löslich postulierten Oxidosqualen-Lano-

sterol-Cyclase aus Hefe (SHECHTER et al., 1970), während das vergleichbare partikuläre Enzym aus Schweineleber (SHECHTER et al., 1970) und die lösliche Dioxidosqualen-α-Onocerin-Cyclase (ROWAN & DEAN, 1972) auch durch niedrige Konzentrationen dieses Detergenz' gehemmt werden. Der Zusatz kleiner Konzentrationen von Deoxycholat vermag die Squalencyclase aus *Bacillus acidocaldarius* ebenfalls zu aktivieren. Ein gleichgerichteter Deoxycholat-Effekt wird für die Epoxysqualen cyclisierenden Enzyme aus Schweineleber (SHECHTER et al., 1970) und *Ochromonas malhamensis* (BEASTALL et al., 1971) beschrieben; dagegen hat dieses Detergenz kaum Einfluß auf die Aktivität des entsprechenden Hefe-Enzyms (SHECHTER et al., 1970) und hemmt das α-Onocerin synthetisierende Enzym aus *Ononis spinosa* (ROWAN & DEAN, 1972).

Auch bei Triton X-100-Emulgierung des Substrats wird die Aktivität der *Bacillus acidocaldarius*-Squalencyclase durch Zusatz geringer Deoxycholatmengen gesteigert, eine Beobachtung, die, außer im zellfreien Ultraschallhomogenat, auch bei Enzymtests im tritonfreien Solubilisat gemacht wurde. Im Gegensatz dazu hemmt der Zusatz aller getesteten Tween 80-Konzentrationen das untersuchte Enzym.

Die unterschiedlichen, z.T. additiven Effekte bei Kombinationen verschiedener Detergenzien sind vermutlich auf Unterschiede der einzelnen Stoffe in ihrer Wechselwirkung mit der Substratbindungsstelle des Enzyms bzw. ihrer Wirksamkeit bei Substratemulgierung und Enzymsolubilisierung zurückzuführen.

Mit einem in tritonfreiem Solubilisat ermittelten K_m-Wert von 3 µM hat die Squalencyclase aus *Bacillus acidocaldarius* eine offensichtlich höhere Substrataffinität als die Epoxysqualencyclasen aus Schweineleber (K_m 25 µM; YAMAMOTO et al., 1969) und *Ochromonas malhamensis* (K_m 100µM; BEASTALL et al., 1971). Die spezifische Squalencyclase-Aktivität übertrifft in der gereinigten Membranfaktion von *B.a.* mit ca. 60 nMolen Umsatz je mg Protein und Stunde die meisten für vergleichbare Enzyme in der Mikro-

somenfraktion ermittelten Werte (3 µmol/mg·h in Erbsenkeimlingen, 12 nmol/mg·h in *Ochromonas malhamensis*, 4 bis 47 nmol/mg·h in Schweineleber, 20 nmol/mg·h in Schweinehirn; DEAN, 1971).

Hohe Ionenstärke (KCl-Zusatz) erniedrigt die unter optimalen Tritonkonzentrationen gemessene *Bacillus acidocaldarius*-Squalencyclase-Aktivität sowohl im Ultraschallhomogenat als auch im tritonfreien Solubilisat. Eine solche Hemmung wird auch für die Epoxysqualen-Lanosterol-Cyclase aus Hefe (SHECHTER et al., 1970) beschrieben; die vergleichbaren Enzyme aus *Ochromonas malhamensis* (BEASTALL et al., 1971), Schweineleber (SHECHTER et al., 1970) und *Ononis spinosa* (ROWAN & DEAN; 1972) werden dagegen durch KCl-Zugabe stimuliert. Das Ergebnis, daß im tritonfreien Solubilisat KCl bei suboptimaler (d.h. <0.2 mg/ml) Triton X-100-Konzentration in geringer Konzentration die untersuchte Squalencyclase aktiviert und erst in höheren Konzentrationen hemmend wirkt, könnte indirekt verursacht sein. Möglicherweise steht in Lösungen niedriger Ionenstärke unterhalb von 0.2 mg/ml nicht genügend Triton X-100 zur Substratemulgierung zur Verfügung, so daß sowohl eine Stärkung der hydrophoben Wechselwirkungen durch Ionenstärke-Erhöhung im Medium als auch eine Steigerung der Tritonkonzentration die Substratemulgierung verbessern und somit die Enzymaktivität erhöhen können.

Die Squalencyclase aus *Bacillus acidocaldarius* enthält offensichtlich eine oder mehrere essentielle Cysteinreste, wie ihre Hemmbarkeit durch die SH-Reagenzien p-Chlormercuribenzolsulfonsäure bzw. N-Ethylmaleimid beweist. Selbst im zellfreien Ultraschallhomogenat wird die untersuchte Enzymaktivität bereits bei 1 µM Konzentrationen des quecksilberhaltigen Agenz' zu 96% gehemmt, ein Effekt, der auch für die Epoxysqualencyclase aus *Ochromonas malhamensis* beschrieben wird (BEASTALL et al., 1971). Die Hemmung durch N-Ethylmaleimid - eine ebensolche beschreiben DEAN et al. (1967) für die Epoxysqualen-Lano-

sterol-Cyclase aus Schweineleber (1 mM N-Ethylmaleimid hemmt dort 20% der Enzymaktivität) - ist weniger effektiv als die für die p-Chlormercuribenzolsulfonsäure beobachtete (1 mM N-Ethylmaleimid hemmt 20% der Squalencyclase-Aktivität im tritonfreien Solubilisat). Durch Anwesenheit von Substrat kann das untersuchte Enzym nicht vor der Hemmung durch N-Ethylmaleimid geschützt werden. Deshalb ist zu vermuten, daß die essentielle SH-Gruppe nicht unmittelbar an der Bindung des Squalens beteiligt ist. Durch SH-Reagenzien scheint das Enzym dennoch so stark modifiziert zu werden, daß es, möglicherweise durch eine Konformationsänderung, viel von seiner Aktivität verliert.

Die beobachtete Hemmbarkeit der Squalencyclase durch Diethylpyrocarbonat deutet auf eine essentielle Histidylgruppe im Enzym hin, doch reagiert dieses Reagenz, wenn auch bei dem getesteten pH (pH 6) bevorzugt mit Histidylgruppen, auch mit anderen funktionellen Aminosäureresten, z.B. Aminogruppen (MEANS & FEENEY, 1971).

Serylgruppen scheinen für die Aktivität des untersuchten Enzyms nicht wesentlich zu sein, denn zugesetztes Phenylmethansulfonylfluorid übt auf diese keinen Einfluß aus.

AMO 1618, (2-Isopropyl-5-methyl-4-trimethylammoniumchlorid)-phenyl-piperidincarboxylat, stellt einen weiteren effektiven Hemmstoff der *Bacillus acidocaldarius*-Squalencyclase dar; schon in 1 µM Konzentration unterdrückt diese Verbindung 78% der Enzymaktivität im tritonfreien Solubilisat. AMO 1618 wird als synthetischer Wachstumsregulator bei Zierpflanzen eingesetzt, um einen buschigen Wuchs zu erzielen (JAKUBKE & JESSCHKEIT, 1975). Diese Wirkung wird auf seine Hemmung der Biosynthese von Gibberellinen - tetracyclischen Diterpen-Phytohormonen, die das Längenwachstum der Pflanzen fördern - zurückgeführt. Während AMO 1618 dort die Cyclisierung von Geranylgeranylpyrophosphat zu Capaol unterdrückt (SHECHTER & WEST, 1969), hemmt es in Tabakpflanzen (DOUGLAS & PALEY, 1972) und Fingerhut (DOUGLAS & PALEY, 1978) die Epoxysqualen-Cycloartenol-Cyclase. Eine Hemmung durch diesen Stoff wird auch für die Oxido-

squalen-Lanosterol-Cyclase aus Rattenleber (DOUGLAS & PALEY, 1972) und die Dioxidosqualen-α-Onocerin-Cyclase aus *Ononis spinosa* (ROWAN & DEAN, 1972) beschrieben; daneben inhibiert es auch die Hydroxymethylglutaryl-Coenzym A-Reduktase (HMG-CoA-Reduktase) in Tabakpflanzen (DOUGLAS & PALEY, 1978). Deshalb kann seine Wirkung nicht als besonders spezifisch für die Cyclasereaktionen angesehen werden; ROWAN und DEAN (1972) führen seine Wirksamkeit auf angeblich detergenzähnliche Eigenschaften zurück. Dies würde auch eine AMO 1618-Hemmbarkeit der untersuchten Squalencyclase erklären, wenn auch die stark hemmende 1 µM Konzentration dieses Hemmstoffes weit unter der Größenordnung von z.B. hemmenden Triton X-100-Konzentrationen liegt (1 µM Triton X-100 = 0.6 µg/ml).

Wahrscheinlich benötigt die Squalencyclase aus *Bacillus acidocaldarius*, genau wie die Epoxysqualencyclase aus Schweineleber (DEAN et al., 1967), keine zweiwertigen Ionen, die von EDTA komplexiert werden können, denn Zusatz dieses Komplexbildners hatte keinen Einfluß auf die beobachtete Enzymaktivität.

Für die Squalencyclase aus *Bacillus acidocaldarius* wurde ein Reinigungsverfahren entwickelt, das das Enzym 270fach gegenüber dem zellfreien Ultraschallhomogenat anreichert. Dabei resultiert allein aus der Tritonbehandlung der Membranfraktion eine ca. 50fache Steigerung der spezifischen Enzymaktivität gegenüber dem Rohhomogenat und eine 10fache gegenüber der Membran. Vergleichbare Enzyme konnten erst nach Ammoniumsulfatfällung aus dem Deoxycholat-Solubilisat ähnlich stark angereichert werden, so die Oxidosqualen-β-Amyrin-Cyclase aus Erbsenkeimlingen etwa 12fach (DEAN, 1969) und die Oxidosqualen-Lanosterol-Cyclase aus Schweineleber ca. 20fach (DEAN et al., 1967); eine bessere Anreicherung, 120fach gegenüber der Mikrosomenfraktion, wurde für die Oxidosqualen-Cycloartenol-Cyclase aus *Ochromonas malhamensis* erst nach sich anschließender Gelchromatographie an Sephadex G-200 erzielt

(BEASTALL et al., 1971). Im vorliegenden Fall konnte das Triton X-100-Solubilisat einer direkten DEAE-Chromatographie in Gegenwart von Detergenz unterzogen werden. Der dadurch erzielte Anreicherungsgrad, 270fach gegenüber dem Rohhomogenat und mehr als 5fach gegenüber dem Solubilisat, gibt vermutlich nicht den wahren Wert für die Reinigung an, weil etwa 95% des auf den Anionenaustauscher aufgetragenen Proteins durch die Chromatographie von der Squalencyclase-Aktivität abgetrennt werden konnten. Obwohl nahezu alle enzymaktivitätshaltigen Proben des Säuleneluats zur Squalencyclase-Fraktion vereinigt wurden, wurde darin eine geringere Enzymaktivität gemessen, als sie nach Berechnungen aus dem Säulenprofil erwartet worden wäre. Auch die Ausbeute an der Gesamtaktivität der Squalencyclase nach der Ionenaustauschchromatographie (33%) zeigt, daß Teile dieses Enzyms durch diese Reinigungsprozedur inaktiviert werden. Diese Desaktivierung setzte sich auch in den darauffolgenden Reinigungsschritten fort und konnte auch durch EDTA- und DTT-Zusatz nicht verhindert werden. Da der Zusatz von hitzedenaturiertem *B.a.*-Ultraschallhomogenat diesen Aktivitätsverlust weder aufheben noch verkleinern konnte, ist es unwahrscheinlich, daß durch die DEAE-Chromatographie ein hitzestabiler Aktivator (z.B. ein Metallion) abgetrennt wurde. Wahrscheinlicher ist der Verlust eines Stabilisators, so daß das, noch im tritonfreien Solubilisat über Wochen stabil bleibende, Enzym nach der Ionenaustauschchromatographie beschleunigt denaturiert und/oder proteolysiert werden kann. Vielleicht bindet die solubilisierte Squalencyclase ein für ihre Stabilität wichtiges Lipid, welches durch das Waschen der Säule mit detergenzhaltigem Puffer von dem an das Säulenmaterial gebundenen Enzym abgelöst wird.

Vergleicht man das Proteinmuster nach den verschiedenen Reinigungsschritten, so fällt auf, daß ein Protein mit einem apparenten Molekulargewicht von M_r=75000 besonders stark angereichert wird. Dieses könnte mit der untersuchten Squalencyclase identisch sein. Mit diesem Moleku-

largewicht nicht vereinbar ist das Laufverhalten der Squalencyclase-Aktivität bei der Gelchromatographie an Sephadex G 100, doch könnte die Elution des Enzyms mit dem Ausschlußvolumen der Säule auf eine, vielleicht durch die zuvor erfolgte Detergenzentfernung erleichterte, Proteinaggregation zurückzuführen sein. Mit M_r=75000 hätte die Squalencyclase aus *Bacillus acidocaldarius* ein relatives Molekulargewicht, das in der Größenordnung der Epoxysqualencyclase aus Schweineleber liegt (M_r=90000; YAMAMOTO et al., 1969) ; für das vergleichbare Enzym aus *Ochromonas malhamensis* wurde ein relatives Molekulargewicht von M_r= 190000 ermittelt (BEASTALL et al., 1971).

Ein Beweis, daß es sich bei dem Protein mit M_r=75000 tatsächlich um die untersuchte Squalencyclase handelt, konnte nicht erbracht werden, weil die Immunisierung von Mäusen bzw. eines Kaninchens mit der entsprechenden, homogenisierten Bande eines SDS-Polyacrylamid-Gels erfolglos blieb. Die gewonnen Antiseren zeigten keine Reaktion mit dem Protein mit M_r=75000, welches für den immunochemischen Test nach elektrophoretischer Auftrennung der angereicherten Squalencyclase-Fraktion im SDS-Gel zusammen mit den übrigen Proteinen dieser Fraktion auf Nitrocellulosefilter elektrotransferiert worden war. Erwartungsgemäß hatten die Antiseren auch keine hemmende Wirkung auf die Aktivität der Squalencyclase. Möglicherweise war die Menge des gespritzten Antigens (2mal je ca. 80 µg/Kaninchen bzw. ca. 20 µg/Maus) zu gering, um eine sichtbare Immunantwort zu erhalten. Hinweise darauf, daß die mißlungene Immunisierung vielleicht auch in einer zu geringen Immunogenität des gespritzten Antigens begründet lag, liefert die beobachtete schwache Reaktion der Mäuseseren mit zwei höhermolekularen Proteinbanden, die durch Verunreinigungen des Antigens mit Proteolyseprodukten dieser Proteine zu erklären wäre.

Ein erfolgreiches Immunisieren durch wiederholtes Spritzen größerer Antigenmengen wäre denkbar. Ob eine solche Immunisierung mit einer SDS-denaturierten Proteinbande

auch Antikörper liefert, die das native Protein erkennen können, bliebe abzuwarten. Möglicherweise kann das Molekulargewicht der Squalencyclase aber auch erst durch monoklonale Antikörper, die die Squalencyclase hemmen, geklärt werden, indem diese mit einer spezifischen Bande im Elektrotransferogramm (Blot) eines SDS-Gels von *Bacillus acidocaldarius*-Proteinen reagieren.

Untersuchungen zum Verwandtschaftsgrad zwischen verschiedenen Squalen- und Epoxysqualencyclasen wären dagegen schon mit Antiseren möglich, die gegen ein z.B. 270-fach angereichertes Enzym gewonnen wurden und in vitro eine Hemmung der Squalencyclase bewirken.

Für eine weitere Enzymcharakterisierung wäre es erstrebenswert, die Bedingungen der Ionenaustauschchromatographie so zu verändern, daß die Squalencyclase möglichst wenig ihrer Stabilität einbüßt. Vielleicht wäre hier eine Chromatographie in Gegenwart von Substrat und/oder Lipid hilfreich.

Ein erstrebenswerter Einsatz einer gereinigten Squalencyclase ist in der Synthese größerer Mengen Hopen und/oder Diplopterol zu sehen. Hierfür wäre es vielleicht sinnvoller, das Enzym aus einem Organismus zu isolieren, der sich auf Grund eines höheren Hopanoidgehalts vielleicht auch durch einen größeren Squalencyclase-Gehalt auszeichnet. Enzyme mesophiler Organismen hätten dabei den zusätzlichen Vorteil, daß unter weniger extremen Reaktionsbedingungen optimale Syntheseraten zu erzielen wären. Auch gentechnologisch ließen sich größere Mengen an Squalencyclase herstellen. Um dabei eine erfolgreiche Genklonierung nachweisen zu können, wären monospezifische Antikörper - d.h. Reagenzien, die ausschließlich mit diesem Enzym reagieren (also monoklonale Antikörper oder Antikörper gegen eine bis zur Homogenität gereinigte Squalencyclase) - notwendig. Alternativ könnte das Squalencyclase-Gen in transformierten Bakterien durch Hybridisierung der Klone mit einem auf Basis einer Aminosäureteilsequenz der Squalencyclase chemisch synthetisierten Oligonucleotid nachgewiesen werden.

V. ZUSAMMENFASSUNG

Die Squalencyclase aus *Bacillus acidocaldarius* wurde nach Entwicklung eines geeigneten Enzymtests charakterisiert und angereichert.

Das untersuchte Enzym ist membrangebunden. Es cyclisiert sein Substrat ohne Beteiligung von molekularem Sauerstoff zu den pentacyclischen Triterpenen Hopen und Diplopterol. Beide Produkte werden in einem konstanten Verhältnis von 1:5 Molen Diplopterol zu Molen Hopen gebildet. Das Temperatur- und pH-Optimum entsprechen mit 60 °C und pH 6 der optimalen Wachstumtemperatur und dem intrazellulären pH des Bakteriums. Halbmaximale Umsatzraten wurden bei 3 µM Squalen (K_m-Wert) beobachtet. Neben dem Einfluß verschiedener Detergenzien wurde u.a. auch die Wirkung wechselnder Ionenstärke und verschiedener gruppenspezifischer Reagenzien auf die Enzymaktivität untersucht. Die beobachtete Hemmung durch p-Chlorbenzolsulfonsäure und N-Ethylmaleimid deutet dabei auf eine essentielle SH-Gruppe im Enzym hin.

Die Squalencyclase konnte durch Extraktion der gereinigten *Bacillus acidocaldarius*-Membran mit geeigneten Konzentrationen von Triton X-100 und anschließende Anionenaustauschchromatographie in Gegenwart von Detergenz ca. 300fach gegenüber dem zellfreien Ultraschallhomogenat angereichert werden.

VI. LITERATURVERZEICHNIS

B. ALBERTS,D. BRAY, J. LEWIS, M. RAFF, K. ROBERTS, J. D. WATSON (1983): Molecular Biology of the Cell. Garland, New York, London.

P. ALBRECHT, G. OURISSON (1971): Biogene Substanzen in Sedimenten und Fossilien. Angewandte Chemie 83, 221-238.

B. H. AMDUR, E. I. SZABO, S. S. SOCRANSKY (1978): Presence of Squalene in Gram Positive Bacteria. J. Bact. 135, 161-163.

C. ANDING, M. ROHMER, G. OURISSON (1976): Non Specific Biosynthesis of Hopane Triterpenes in a Cell-Free System from Acetobacter rancens. J. Am. Chem. Soc. 98, 1274-1275.

K. D. BARROW, J. G. COLLINS, P. L. ROGERS, G. M. SMITH (1983): Lipid Composition of an Ethanol-Tolerant Strain of Zymomonas mobilis. Biochim. Biophys. Acta 753, 324-330.

D. H. R. BARTON, G. MELLOWS, D. A. WIDDOWSON (1971): Biosynthesis of Terpenes and Steroids. Part I. Squalene Cyclization in the Biosynthesis of Triterpenoids: the Biosynthesis of Fern-9-ene in Polypodium vulgare Linn. J. Chem. Soc. (C), 110-116.

D. H. R. BARTON, T. R. JARMAN, K. C. WATSON, D. A. WIDDOWSON, R. B. BOAR, K. DAMPS (1975): Investigations on the Biosythesis of Steroids and Terpenoids. Part XII. Biosynthesis of 3ß-Hydroxy-Triterpenoids and -Steroids from (3S)-2,3-Epoxy-2,3-Dihydrosqualene. J. Am. Soc. Perkin Trans. I, 1134-1138.

B. BATTEIGER, W. J. NEWHALL V, R. B. JONES (1982): The Use of Tween 20 as Blocking Agent in the Immunological Detection of Proteins Transferred to Nitrocellulose Membranes. J. Immunolog. Meth. 55, 297-307.

C. H. BEASTALL, H. H. REES, T. W. GOODWIN (1971): Properties of a 2,3-Oxido Squalene Cycloartenol Cyclase from Ochromonas malhamensis. FEBS Lett. 18, 175-178.

R. BENZ, D. HALLMANN, K. PORALLA, J. EIBL (1983): Interaction of Hopanoids with Phosphatidylcholines Containing Oleic and ω-Cyclohexyldodecanoic Acid in Lipid Bilayer Membranes. Chem. Phys. Lipids 34, 7-24.

P. BISSERET, G. WOLFF, A.-M. ALBRECHT, T. TANAKA, Y. NAKATANI, G. OURISSON (1983): A Direct Study of the Cohesion of Lecithin Bilayers: The Effect of Hopanoids and α,ω-Dihydroxycarotinoids. Biochem. Biophys. Res. Comm. 110, 320-324.

R. BLAICH (1978): Analytische Elektrophoreseverfahren. Thieme Verlag, Stuttgart.

M. S. BLAKE, K. H. JOHNSTON, G. J. RUSSELL-JONES, E. C. GOTSCHLICH (1984): A Rapid, Sensitive Method for Detection of Alkaline Phosphatase-Conjugated Anti-Antibody in Western Blots. Anal. Biochem. 136, 175-179.

E. G. BLIGH, W. J. DYER (1959): A Rapid Method of Total Lipid Extraction and Purification. Can. J. Biochem. Physiol. 37, 911-917.

K. BLOCH (1979): Speculations on the Evolution of Sterol Structure and Function. Crit. Rev. Biochem. 7, 1-5.

K. BLOCH (1983): Sterol Structure and Membrane Function. Crit. Rev. Biochem. 14, 47-92.

P. BOUVIER, Y. BERGER, M. ROHMER, G. OURISSON (1980): Non-Specific Biosynthesis of Gammercane Derivatives by a Cell-Free System from the Protozoon Tetrahymena pyriformis. Eur. J. Biochem. 112, 549-556.

S. BRINGER, T. HÄRTNER, K. PORALLA, H. SAHM (in Vorbereitung): Hopanoid and Fatty Acid Fluctuations in Batch and Continous Cultures of Zymomonas mobilis.

G. CERNY, W. HENNLICH, K. PORALLA (1984): Fruchtsaftverderb durch Bacillen. Isolierung und Charakterisierung des Verderberregers. Z. Lebensm. Unters. Forsch. 174, 1-4.

H. W. CHANG, E. BOCK (1980): Pitfalls in the Use of Commercial Nonionic Detergents for the Solubilization of Integral Membrane Proteins: Sulfhydryl Oxidizing Contaminants and Their Elimination. Anal. Biochem. 104, 112-117.

P. S. J. CHEETHAM (1979): Removal of Triton X-100 from Aqueous Solution Using Aberlite XAD 2. Anal. Biochem. 92, 447-452.

T. G. COOPER (1981): Biochemische Arbeitsmethoden. W. de Gruyter, Berlin, New York.

C. E. DAHL, J. S. DAHL, K. BLOCH (1980a): Effects of Cycloartenol and Lanosterol on Artificial and Natural Membranes. Biochem. Biophys. Res. Comm. 92, 221-228.

J. S. DAHL, C. E. DAHL, K. BLOCH (1980b): Sterols in Membranes: Growth Chracteristics and Membrane Properties of Mycoplasma capricolum Cultured on Choletserol and Lanosterol. Biochemistry 19, 1467-1472.

J. S. DAHL, C. E. DAHL, K. BLOCH (1981): Effect of Cholesterol on Macromolecular Synthesis and Fatty Acid Uptake by Mycoplasma capricolum. J. Biol. Chem. 256, 87-91.

G. DARLAND, T. D. BROCK (1971): Bacillus acidocaldarius sp. nov., an Acidophilic Spore-Forming Bacterium. J. Gen. Microbiol. 67, 9-15.

P. D. G. DEAN, P. R. ORTIZ de MONTELLANO, K. BLOCH, J. COREY (1967): A Soluble 2,3-Oxidosqualene Sterol Cyclase. J. Biol. Chem. 242, 3014-3015.

P. D. G. DEAN (1969): Enzymatic Cyclization of Squalene- 2,3-Oxide. Meth. Enzymol. 15, 495-501.

P. D. G. DEAN (1971): The Cyclases of Triterpene and Sterol Biosynthesis. Steroidologia 2, 143-157.

J. DE GIER, J. G. MANDERSLOOT, L. L. M. VAN DEENEN (1968): Lipid Composition and Permeability of Liposomes. Biochim. Biophys. Acta, 150, 666-671.

R. A. DEMEL, B. DE KRUYFF (1976): The Function of Sterols in Membranes. Biochim. Biophys. Acta 457, 109-132.

M. DE ROSA, A. GAMBACORTA, L. MINALE, J. D. BU'LOCK (1971): Cyclohexane Fatty Acids from a Thermophilic Bacterium. J. Chem. Soc. Chem. Comm., 1334-1337.

M. DE ROSA, A. GAMBACORTA, J. D. BU'LOCK (1973): Isoprenoids of Bacillus acidocaldarius. Phytochem. 12, 117-1123.

S. R. DICKMAN (1961): Aconitase.The Enzymes V, 495-510; P. D. Boyer, H. Lardy, K. Myrbäck, Ed.; Academic Press, New York.

T. J. DOUGLAS, L. G. PALEY (1972): Inhibition of Sterol Biosynthesis by 2-Isopropyl-4-dimethylamino-5-methylphenyl-1-piperidine Carboxylate Methyl Chloride in Tabacco and Rat Liver Preparations. Plant Physiol. 49, 417-420.

T. J. DOUGLAS, L. G. PALEY (1978): AMO 1618 Effects on Incorporation of ^{14}C-MVA and ^{14}C-Acetat into Sterols in Nicotiana and Digitalis Seedlings and Cell-Free Preparation from Nicotiana. Phytochem. 17, 713-718.

G. S. EADIE (1942): The Inhibition of Cholinesterase by Physostigmine and Prostigmine. J. Biol. Chem. 146, 85-93.

A. J. FURTH (1980): Removing Unbound Detergent from Hydrophobic Proteins. Anal. Biochem. 109, 207-215.

P. W. HALLOWAY (1973): A Simple Procedure for Removal of Triton X-100 from Protein Sample. Anal. Biochem. 53, 304-308.

C. S. HANES (1932): Studies on Plant Amylases. I. The Effect of Starch Concentration upon the Velocity of Hydrolysis by the Amylase of Geminated Barley. Biochem. J. 26, 1406-1421.

J. R. HANSEN (1971-1983), Ed.: Terpenoids and Steroids, Band 1-12. The Royal Society of Chemistry, London.

A. HARA, N. S. RADIN (1978): Lipid Extraction of Tissue with a Low-Toxicity Solvent. Anal. Biochem. 90, 420-426.

S. HATA, T. NISHINO, N. ARIGA, K. KATSUKI (1982): Effects of Detergents on Sterol Synthesis in a Cell-Free System of Yeast. J. Lipid Res. 23, 803-811.

R. HAWKES, E. NIDAY, J. GORDON (1982): A Dot-Immunobinding Assay for Monoclonal and Other Antibodies. Anal. Biochem. 119, 142-147.

R. HEINTZ, P. BENVENISTE (1974): Plant Sterol Metabolism - Enzymatic Cleavage of the 9β,19β-Cyclopropane Ring of Cyclopropyl Sterols in Bramble Tissue Cultures. J. Biol. Chem. 249, 4267-4274.

A. HELENIUS, H. SÖDERLUND (1973): Stepwise Dissociation of the Semliki Forest Virus Membrane with Trton X-100. Biochim. Biophys. Acta 307, 287-300.

A. HELENIUS, K. SIMONS (1975): Solubilization of Membranes by Detergents. Biochim. Biophys. Acta 415, 29-79.

A. HELENIUS, D. R. McCASLIN, E. FRIES, C. TANFORD (1979): Properties of Detergents. Meth. Enzymol. 56, 734-749.

B. HIPPCHEN, A. RÖLL, K. PORALLA (1981): Occurence in Soil of Thermo-Acidophilic Bacilli Possessing ω-Cyclohexan Fatty Acids and Hopanoids. Arch. Mikrobiol. 129, 53-55.

B. H. J. HOFSTEE (1952): Specifity of Esterase. I. Identification of Two Pancreatic Aliesterases. J. Biol. Chem. 199, 357-364.

G. HUSSLER, P. ALBRECHT, G. OURISSON (1984): Benzohopanes, a Novel Family of Hexacyclic Geomarkers in Sediments and Petroleums. Tetrahedron Lett. 25, 1179-1182.

H.-D. JAKUBKE, H. JESSCHKEIT (1975), Eds. : Brockhaus ABC-Biochemie. Brockhaus Verlag, Leipzig.

A. JOHNSTONE, R. THORPE (1982): Immunochemistry in Practice. Blackwell Scientific Publications, Oxford, London, Edinburgh, Boston, Melbourne.

H. R. KABACK (1970): Bacterial Membranes. Meth. Enzymol. 22, 99-120.

E. KANNENBERG, K. PORALLA, A. BLUME (1980): A Hopanoid from the Thermo-Acidophilic Bacillus acidocaldarius Condenses Membranes. Naturwissenschaften 67, 458-459.

E. KANNENBERG, K. PORALLA (1982): The Influence of Hopanoids on Growth of Mycoplasma mycoides. Arch. Microbiol. 133, 100-102.

E. KANNENBERG (1983): Membraneigenschaften von Hopanoiden und Lipiden, die Fettsäuren mit endständigen Verzweigungen und ω-Cyclohexanringen enthalten. Dissertation, Fakultät für Biologie der Eberhard-Karls-Universität Tübingen.

E. KANNENBERG, A. BLUME, R. N. McELHANEY, K. PORALLA (1983): Monolayer and Calorimetric Studies of Phosphatidylcholines Containing Branched-Chain Fatty Acids and of Their Interactions with Cholesterol and with a Bacterial Hopanoid in Model Membranes. Biochim. Biophys. Acta 733, 111-116.

M. KATES (1982): Techniques of Lipidology. Isolation, Analysis and Identification of Lipids. T. S. Work, E. Work, Eds.; North-Holland, American Elsevier, Amsterdam, London, New York.

R. M. KROPPENSTEDT (1982): Anwendung chromatographischer HP-Verfahren (HPTLC und HPLC) in der Bakterien-Taxonomie. GIT Lab. Med. 5, 266-275.

T. A. KRULWICH, L. F. DAVIDSON, J. F. STANLEY, R. S. ZUCKERMAN, A. A. GUFFANTI (1978): The Protonmotive Force and B-Galactoside Transport in Bacillus acidocaldarius. J. Biol. Chem. 253, 4599-4607.

B. D. LADBROOKE, R. M. WILLIAMS, D. CHAPMAN (1968): Studies on Lecethin-Cholesterol-Water Interactions by Differential Scanning Calorimetry and X-Ray Diffraction. Biochim. Biophys. Acta 150, 333-339.

U. K. LAEMMLI (1970): Cleavage of Structural Protein During the Assembly of the Head of Bacteriophage T 4. Nature 227, 680-685.

T. A. LANGWORTHY, W. R. MAYBERRY, P. F. SMITH (1976): A Sulfonolipid and Novel Glucosamidyl Glycolipids from the Extreme Thermoacidophilic Bacillus acidocaldarius. Biochim. Biophys. Acta 431, 550-569.

T. A. LANGWORTHY, W. R. MAYBERRY (1976): A 1,2,3,4-Tetrahydroxy Pentane-Substituated Pentacyclic Triterpene from Bacillus acidocaldarius. Biochim. Biophys. Acta 431, 570-577.

J. K. LANYI, W. Z. PLACHY, M. KATES (1974): Lipid Interactions in Membranes of Extremely Halophilic Bacteria. II. Modification of the Bilayer Structure by Squalene. Biochemistry 13, 4914-4920.

H. LINEWEAVER, D. BURK (1934): The Determination of Enzyme Dissociation Constants. J. Am. Chem. Soc. 56, 658-666.

F. B. MALLORY, R. L. CONNER, J. R. LANDREY, J. M. ZANDER, J. B. GREIG, E. CASPI (1968): Evidence for a Nonoxidative Cyclization of Squalene in the Biosynthesis of Tetrahymanol. J. Am. Chem. Soc. 90, 3563-3564.

F. B. MALLORY, R. L. CONNOR (1971): Dehydrogenation and Dealkylation of Various Sterols by Tetrahymena pyriformis. Lipids 6, 149-153.

P. Manitto (1981): Biosynthesis of Natural Products. E. Horwood, Ed.; Chichester.

T. H. MAUGH II (1982): Completing the Puzzle of Steroid Synthesis. Science 218, 1297.

G. E. MEANS, R. E. FEENEY (1971): Chemical Modification of Proteins. Holden-Day, San Francisco.

D. E. METZLER (1977): Biochemistry - The Chemical Reactions of Living Cells. Academic Press; New York, San Francisco, London.

W. R. NES (1974): Role of Sterols in Membranes. Lipids 9, 596-612.

R. NAVARRETE, R. SERRANO (1983): Solubilization of Yeast Plasma Membranes and Mitochondria by Different Types of Non-Denaturating Detergents. Biochim. Biophys. Acta 728, 403-408.

J. M. ODRIOZOLA, E. WAITZKIN, T. L. SMITH, K. BLOCH (1978): Sterol Requirement of Mycoplasma capricolum. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 75, 4107-4109.

M. J. OSBORN, J. E. GANDER, E. PARISI, J. CARSON (1972): Mechanism of Assembly of the Outer Membrane of Salmonella thyphimurium. J. Biol. Chem. 247, 3962-3972.

T. OSHIMA, H. ARAKAWA, M. BABA (1977): Biochemical Studies on an Acidophilic, Thermophilic Bacterium, Bacillus acidocaldarius: Isolation of Bacteria, Intracellular pH, and Stabilities of Biopolymers. J. Biochem. 81, 1107-1113.

G. OURISSON, P. ALBRECHT, M.ROHMER (1979a): The Hopanoids - Palaeochemistry and Biochemistry of a Group of Natural Products. Pure & Appl. Chem. 51, 709-729.

G. OURISSON, M. ROHMER, R. ANTON (1979b): From Terpenes to Sterols. Macroevolution and Microevolution. Recent Adv. Phytochem. 13, 131-162.

G. OURISSON, P. ALBRECHT, M. ROHMER (1982): Predictive Microbial Biochemistry - from Molecular Fossils to Procaryotic Membranes. Trends Biochem. Sci. 7, 236-239.

H. S. PENEFSKY, A. TZAGOLOFF (1971): Extraction of Water-Soluble Enzymes and Proteins from Membranes. Meth. Enzymol. 22, 204-219.

G. L. PETERSON (1977): A Simplification of the Protein Assay Method of Lowry et al. Which is More Generally Applicable. Anal. Biochem. 83, 346-356.

K. PORALLA, E. KANNENBERG, A. BLUME (1980): A Glycolipid containing Hopane Isolated from the Acidophilic, Thermophilic Bacillus acidocaldarius, Has a Cholesterol-Like Function in Membranes. FEBS Lett. 113, 107-110.

K. PORALLA (1982a): Hopanoide - Steroidequivalente in Membranen von Bakterien. Forum Mikrobiologie 4, 176-179.

K. PORALLA (1982b): Considerations on the Evolution of Steroids as Membrane Components. FEMS Microbiol. Lett. 13, 131-135.

K. PORALLA, W. A. KÖNIG (1983): The Occurrence of ω-Cycloheptane Fatty Acids in a Thermo-Acidophilic Bacillus. FEMS Microbiol. Lett. 16, 303-306.

K. PORALLA, T. HÄRTNER, E. KANNENBERG (1984): Effect of Temperature and pH on the Hopanoid Content in Bacillus acidocaldarius. FEMS Microbiol. Lett. 23, 253-256.

A. PRADO, J. L. R. ARRONDO, A. VILLENA, F. M. GOÑI, J. M. MACARULLA (1983): Membrane-Surfactant Interactions. The Effect of Triton X-100 on Sarcoplasmic Reticulum Vesicles. Biochim. Biophys. Acta 733, 163-171.

M. RAMGOPAL, K. BLOCH (1983): Sterol Synergism in Yeast. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 80, 712-715.

D. A. REAVELEY, H. J. ROGERS (1969): Some Enzymic Activities and Chemical Properties of the Mesosomes and Cytoplasmic Membranes of Bacillus licheniformis 6346. Biochem. J. 113, 67-79.

J. H. RICHARDS, J. B. HENDRICKSON (1964): Biosynthesis of Terpenes, Steroids and Acetogenins. W. A. Benjamin; Amsterdam, New York.

M. ROHMER, P. BOUVIER, G. OURISSON (1979): Molecular Evolution of Biomembranes: Structural Equivalents and Phylogenetic Precursors of Sterols. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 76, 847-851.

M. ROHMER, C. ANDING, G. OURISSON (1980a): Non-Specific Biosynthesis of Hopane Triterpenes by a Cell-Free System from Acetobacter pasteurianum. Eur. J. Biochem. 112, 541-547.

M. ROHMER, P. BOUVIER, G. OURISSON (1980b): Non-Specific Lanosterol and Hopanoid Biosynthesis by a Cell-Free System from the Bacterium Methylococcus capsulatus. Eur. J. Biochem. 112, 557-560.

M. ROHMER, P. BOUVIER-NAVE, G. OURISSON (1984): Distribution of Hopanoid Triterpenes in Procaryotes. J. Gen. Microbiol. 130, 1137-1150.

M. G. ROWAN, P. D. G. DEAN (1972): Properties of Squalene-2(3),22(23)-Diepoxide- α-Onocerin Cyclase from Ononis spinosa Root. Phytochem. 11, 3111-3118.

S. A. RUDOLPH, B. K. KRUEGER (1979): Endogenous Protein Phosphorylation and Dephosphorylation. Adv. Cycl. Nucl. Res. 10, 107-133.

Y. A. SAAT, K. BLOCH (1976): Effect of a Supernatend Protein on Microsomal Squalene Epoxidase and 2,3-Oxidosqualene-Lanosterol Cyclase. J. Biol. Chem. 251, 5155-5160.

T. J. SCALLEN, W. J. DEAN, M. W. SCHUSTER (1968): Enzymatic Conversion of Squalene to Cholesterol by an Aceton Powder of Rat Liver Microsomes. Biochem. Biophys. Res. Comm. 31, 287-293.

J. SCHMIDT, S. HUNECK (1979): Mass Spectroscopy of Natural Products. VI. Localisation of functional Groups in the Hopane Skeleton. Organic Mass Spectrometry 14, 656-662.

I. SHECHTER, C.A. WEST (1969): Biosynthesis of Gibberellins. IV. Biosynthesis of Cyclic Diterpenes from trans-Geranylgeranyl-Pyrophosphate. J. Biol. Chem. 244, 3200-3209.

I. SHECHTER, F. W. SWEAT, K. BLOCH (1970): Comparative Properties of 2,3-Oxidosqualene-Lanosterol Cyclase from Yeast and Liver. Biochim. Biophys. Acta 220, 463-468.

L. STRYER (1981): Biochemistry. Freeman & Company; San Francisco.

R. P. TRACY, J. A. KATZMANN, T. K. KIMLINGER, G. A. HURST, D. S. YOUNG (1983): Development of Monoclonal Antibodies to Proteins Separated by Two-Dimensional Gel Electrophoresis. J. Immunolog. Meth. 65, 97-107.

A. TZAGOLOFF, H. S. PENEFSKY(1971): Extraction and Purification of Lipoprotein Complexes from Membranes. Meth. Enzymol. 22, 219-230.

F. UCHINO, S. DOI (1967): Acidothermophilic Bacteria from Thermal Waters. Agricult. Biol. Chem. 31, 817-822.

J. VALISOLALAO, N. PERAKIS, B. CHAPPE, P. ALBRECHT (1984): A Novel Sulfur Containing C_{35} Hopanoid in Sediments. Tetrahedron Lett. 25, 1183-1186.

E. E. VAN TAMELEN (1982): Bioorganic Characterization and Mechanism of the 2,3-Oxidosqualene-Lanosterol Conversion. J. Am. Chem. Soc. 104, 6480-6481.

E. E. VAN TAMELEN, E. J. LEOPOLD, S. A. MARSON, H. R. WAESPE (1982): Action of 2,3-Oxidosqualene-Lanosterol Cyclase on 15-Nor-18,19-dihydro-2,3-oxidosqualene. J. Am. Chem. Soc. 104, 6479-6480.

S. YAMAMOTO, K. LIU, K. BLOCH (1969): Some Properties of the Microsomal 2,3-Oxidosqualene-Sterol Cyclase. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 63, 110-117.

C. YANOFSKY, I. P. CRAWFORD (1972): Tryptophan-Synthetase. The Enzymes 7, 1-31. P. D. BOYER, Ed.

P. L. YEAGLE, R. B. MARTIN, A. K. LALA, H. K. LIN, K. BLOCH (1977): Differential Effects of Cholesterol and Lanosterol on Artificial Membranes. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 74, 4924-4929.

J. M. ZANDER, J. B. GREIG, E. CASPI (1970): Tetrahymanol Biosynthesis - Studies in Vitro on Squalene Cyclization. J. Biol. Chem. 245, 1247-1254.

L E B E N S L A U F

BRIGITTE SECKLER geb. WÜBBEN, verheiratet seit dem 4.6.82

28.10.55	geboren in Bremerhaven als Tochter des Dipl. Ing. Bernhard Wübben und der Elisabeth, geb. Kappenhagen
26.04.62	Einschulung: Edith-Stein-Schule, Bremerhaven
14.04.66 bis 09.05.74	Besuch der Wilhelm-Raabe-Schule, Bremerhaven, eines neusprachlichen Gymnasiums, mit Abschluß durch das Abitur
Okt. 74	Beginn des Studiums der Chemie, Diplom, an der Technischen Universität Hannover
Okt. 75	Fachwechsel in das dritte Fachsemester des Studienfachs Biochemie, Diplom
Jan. 77	Diplom-Vorprüfung an der Technischen Universität Hannover
April 77	Wechsel an die Universität Tübingen in das sechste Fachsemester Biochemie, Diplom
Mai 80	mündliche Diplomprüfung
Sept. 80 bis Okt. 81	experimentelle Diplomarbeit am Pharmazeutischen Institut der Universität Tübingen unter Anleitung von Prof. Dr. J. E. Schultz mit dem Thema: "Einfluß cyclischer Nucleotide auf die Proteinphosphorylierung in Cilien von *Paramecium tetraurelia*"
Nov. 81 bis März 84	Dissertation am Institut für Biologie der Universität Tübingen, Lehrbereich Mikrobiologie I, unter Anleitung von Prof. Dr. K. Poralla.

Meine akademischen Lehrer waren :

Physiologische Chemie	:	A. Anderer, H. Bisswanger, W. Lamprecht, G. Maaß, D. Mecke, H. Probst, J. E. Schultz, U. Weser
Organische Chemie	:	E. Bayer, F. Bölsing, H. Hagenmaier, M. Hanack, G. Jung, A. Rieker, H. Stegmann, H. Uffmann, E. Winterfeldt
Pharmakologie	:	H. Bolt, U. Breyer-Pfaff, E. Pfaff, H. Remmer
Physikalische Chemie	:	H. Schmalzried, H. von Weyssenhoff
Physikalische Biochemie	:	W. Voelter, A. Wendel, K. Wegmann
Anorganische Chemie	:	H. J. Berthold, H. Bode, H. Seidel
Physik	:	K. Heilig, H. Welling
Strahlenschutz	:	U. Feine, E. Kallee, H. J. Reinecke
Mathematik	:	D. Grude, D. Feldmann
Humanphysiologie	:	E. Betz, R. Jakob
Anatomie	:	K. Mörike, K. Reutter
Botanik	:	G. Richter
Genetik	:	W. Seyffert
Mikrobiologie	:	V. Braun, K. Poralla, H. Zähner
Zoologie	:	M. Röhrs, W. Weidemann

D. GRÄBNER
Dissertations- u. Offsetdruckerei
Gotenstraße 3
8602 Altendorf bei Bamberg
Telefon 09545 / 8791